

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bedeutung von mTOR, HIF-1 α und CREB für die Prognose von Magenkarzinompatienten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Kainz

2012

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bedeutung von mTOR, HIF-1 α und CREB für die Prognose von Magenkarzinompatienten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Kainz

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Sven A. Lang
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Anja K. Bosserhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2012

Für meine Eltern

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Silvia Kainz
Geburtsdatum/-ort	12.03.1984 in Regensburg
Familienstand	Ledig
Religion	römisch-katholisch

Schulischer Werdegang

06/2003	Abschluss: Abitur, Notenschnitt: 1,2
1994-2003	St. Marien Gymnasium der Diözese Regensburg (Leistungskurse Mathematik und Latein)

Hochschulausbildung

06/2010	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: „sehr gut“
02/09-02/10	Praktisches Jahr, Klinikum der Universität Zürich und Regensburg
04/06-02/10	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Regensburg, Klinischer Abschnitt
03/2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum), Gesamtnote: „gut“
10/03-02/06	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Vorklinischer Abschnitt

Beruf

ab 09/10	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II, Prof. Dr. med. K.-H. Wiedmann, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg
----------	---

Promotion

ab 04/06	„Bedeutung von mTOR, HIF-1 α und CREB für die Prognose von Magenkarzinompatienten“ (klinisch-experimentelle Studie), Prof. Dr. med. H. J. Schlitt, Direktor der Klinik für Chirurgie, Prof. Dr. E. K. Geissler, Lehrstuhl für experimentelle Chirurgie, Arbeitsgruppe PD Dr. med. S. A. Lang, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg
----------	---

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn PD Dr. med. Sven A. Lang, Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Regensburg, und Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja K. Bosserhoff, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg, für die abschließende Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit, für die wertvollen Tipps und die professionelle Unterstützung bei der Fertigstellung dieses Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. med. Oliver Stoeltzing, Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die ursprüngliche Betreuung dieser Doktorarbeit, die Unterstützung bei der Planung und Realisierung dieses Projekts sowie die freundliche Integration ins Team.

Herrn PD Dr. med. Andreas Gaumann, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg, für das Bereitstellen der Gewebeschnitte, die Unterstützung bei der Sammlung klinisch-pathologischer Daten der Tumorpatienten sowie die Auswertung immunhistochemischer Färbungen.

Herrn Dr. med. Christian Moser, Frau Manuela Kovach und allen anderen Laborkollegen für die professionelle Einweisung in die angewandten Arbeitsmethoden, sowie für das freundliche Arbeitsklima im Labor.

Herrn Pauer, Tumorzentrum Regensburg, für die Bereitstellung von Informationen zur Tumornachsorge und zum postoperativen Überleben der analysierten Magenkarzinompatienten.

Der Klinik und Poliklinik für Chirurgie (Prof. Dr. med. H. J. Schlitt) und dem Institut für Pathologie (Prof. Dr. med. F. Hofstädter) des Universitätsklinikums Regensburg, für die Bereitstellung der Tumorbiopsien und der klinischen Daten.

Frau Dr. med. Katrin Thelen für die Unterstützung der statistischen Analyse der akquirierten Daten im Statistikprogramm SPSS.

Meiner Familie, meinen Freunden und Bekannten für ihr Interesse, ihre Kritik und ihre hilfreiche Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Magenkarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Pathologie	1
1.1.3. Tumorklassifikation und Stadieneinteilung	2
1.1.4. Geographische Unterschiede	2
1.1.5. Risikofaktoren und Ätiologie	3
1.1.6. Therapieoptionen	4
1.1.7. Prognostische Faktoren	5
1.2. Sauerstoffhomöostase	6
1.2.1. Hypoxie und Kanzerogenese	7
1.2.2. mTOR	7
1.2.3. HIF-1 α	9
1.2.4. CREB	10
1.2.5. Angiogenese	12
2. Problemstellung und Zielsetzung	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Gewebeproben	14
3.1.1. Herkunft und Art der Proben	14
3.1.2. Befunderhebung und Datensammlung	14

3.1.3.	Klinisch-pathologische Aspekte	14
3.1.4.	Postoperativer Verlauf: Rezidivstatus und Gesamtüberleben.....	16
3.2.	Immunhistochemische Färbungen	16
3.2.1.	Monoklonale Antikörper	16
3.2.2.	Immunhistochemische Färbung von mTOR und CREB	16
3.2.3.	Immunhistochemische Färbung von HIF-1 α	17
3.2.4.	Immunhistochemische Analyse der Tumervaskularisation.....	19
3.3.	Verwendete Materialien.....	19
3.4.	Spezifische Auswertung und Score-Methodik	20
3.5.	Statistische Analysen	21
4.	Ergebnisse	22
4.1.	Immunhistochemie	22
4.2.	mTOR-Analysen	28
4.3.	HIF-1 α -Analysen	32
4.4.	CREB-Analysen	35
4.5.	Analysen zur Tumervaskularisation	37
4.6.	„Survival“-Analysen zum rezidivfreien und zum Gesamt- überleben	40

4.6.1.	Rezidivfreies Überleben	40
4.6.2.	Gesamtüberleben	42
4.7.	Korrelationen zwischen phospho-mTOR, HIF-1α, phospho-CREB, CD31 und CD105.....	43
5.	Diskussion	46
6.	Zusammenfassung	59
7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Abbildungsverzeichnis	68
9.	Tabellenverzeichnis	70
10.	Eidesstattliche Erklärung	72

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
HIF-1 α	Hypoxia inducible Factor 1 α
IGF	Insulin-like Growth Factor
IRS-1	Insulin-Receptor-Substrate-1
Kap.	Kapitel
Lk	Lymphknoten
N	Anzahl
mAb	monoklonaler Antikörper
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MVC	Mean Vessel Count (mittlere Gefäßanzahl)
MW	Mittelwert
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
RFI	Rezidivfreies Intervall (Überleben)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tu	Tumor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
Zyto	Zytoplasma

1. Einleitung

1.1. Magenkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Magenkarzinom steht weltweit an zweiter Stelle der zum Tode führenden Tumorerkrankungen und stellt in Deutschland bei den Männern das fünfthäufigste, bei den Frauen das sechsthäufigste Malignom dar. Während seine Gesamtinzidenz seit über 50 Jahren rückläufig ist, stieg anteilig die Häufigkeit von Adenokarzinomen der Cardia und des ösophagogastralen Übergangs [Hohenberger, 2003; Dicken, 2005; Parkin, 2005; Roukos, 2000; Alberts, 2003; Moehler, 2011].

1.1.2. Pathologie

Histopathologische Einteilung

Über 90% der Magentumore sind Adenokarzinome, welche histologisch nach ihrem Wachstumsmuster in zwei Typen eingeteilt werden (Lauren-Klassifikation): Intestinale Karzinome wachsen in der Regel expansiv-verdrängend, sind glandulär aufgebaut und umschrieben begrenzt. Sie stellen meist gut differenzierte und im Magen eher distal lokalisierte Tumore dar. Der diffuse Typ breitet sich demgegenüber vorwiegend infiltrativ-destruierend in der Magenschleimhaut aus und kommt gehäuft im Bereich der Cardia und bei jüngeren Tumorpatienten (hereditäres diffuses Magenkarzinom) vor [Lauren, 1965; Kelley, 2003; Dicken, 2005; Roukos 2000; Moehler, 2011].

Pathogenese

Die Entstehung des intestinalen Magenkarzinoms umfasst einen stufenweise progredienten Entartungsprozess, an dem mehrere molekulare und morphologische Veränderungen beteiligt sind: Sie beginnt mit chronisch-atropher Gastritis und entwickelt sich über intestinale Metaplasie und Dysplasien zu Magenadenomen und schließlich invasiven Karzinomen (Correa-Hypothese). Eine

wesentliche Rolle spielen hierbei exogene Faktoren wie die *Helicobacter-pylori*-Infektion (s.u.). Bei der Entstehung diffuser Magenkarzinome wird hingegen über genetische Instabilitäten diskutiert. Sie entwickeln sich vermutlich „*de novo*“ aus einzelnen, genetisch-veränderten Stammzellen [Roukos, 2000; Dicken, 2005; Hohenberger, 2003; Alberts, 2003; Moehler, 2011].

Lokalisation der Magenkarzinome

35% der eigentlichen Magenkarzinome sind im distalen Antrum und im Pylorus lokalisiert, 30% an der kleinen Kurvatur und 25% im Bereich der Kardia (übrige Lokalisationen: 10%). Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie, Therapie und Prognose müssen diese gegenüber Karzinomen des ösophagogastralen Überganges (sogenannte AEG-Tumore nach Siewert) abgegrenzt werden [Hohenberger, 2003; Herold, 2005]. Letztere wurden in diese Studie nicht eingeschlossen.

Tumormetastasierung

Die Tumorausbreitung erfolgt zum einen lymphogen (in drei Kompartimente) und per continuitatem in benachbarte Organe, aber auch hämatogen (in Leber, Lunge, Knochen, Gehirn) bis hin zu Peritonealkarzinose und Abtropfmetastasen in die Ovarien (Krukenberg-Tumor) [Herold, 2005].

1.1.3. Tumorklassifikation und Stadieneinteilung

Die Feststellung der Tumorausbreitung (Staging) erfolgt nach der TNM-Klassifikation maligner Tumore der UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Beurteilt werden hierbei der Primärtumor (T), die Lymphknoten (N) und die Fernmetastasen (M) [Herold, 2005]. Grundlage der vorliegenden Studie war die TNM-Klassifikation in der 6. Auflage von 1997. Änderungen der neuen 7. Version von 2010 betreffen vor allem die T- und N-Stadieneinteilung [Moehler, 2011].

1.1.4. Geographische Unterschiede

Die Inzidenz des Magenkarzinoms zeigt deutliche geographische Unterschiede: so gelten Japan,

China, Korea sowie Teile Zentral- und Südamerikas als Hochrisikogebiete mit Inzidenzen von bis zu 90 Magenkarzinomen pro 100 000 männliche Einwohner pro Jahr. Im Vergleich dazu liegt die mittlere Inzidenz in Deutschland bei 27,7 pro 100 000 Männer bzw. bei 19,6 pro 100 000 Frauen pro Jahr. Auch hinsichtlich Tumorlokalisation und -histologie bestehen deutliche regionale Unterschiede: Während 39% der Magenkarzinome der weißen Bevölkerung in den Vereinigten Staaten Cardiatumore darstellen, machen diese in Japan lediglich 4% aller Magentumore aus. Desweiteren dominiert gerade in Hochrisikogebieten auch heute noch der intestinale Typ, wohingegen weltweit betrachtet der Anteil diffuser Karzinome kontinuierlich ansteigt.

Anhand von Migrationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass neben genetischen vor allem Umwelt-, Ernährungs- und Lebensstil-Faktoren das individuelle Lebenszeitrisiko für ein Magenkarzinom kumulativ beeinflussen. Dieses entspricht nach Auswanderung zunächst weiterhin dem der Heimatregion und gleicht sich erst in den folgenden Generationen dem Risiko der neuen Umgebung an [Hohenberger, 2003; Kelley, 2003; Alberts, 2003; Moehler, 2011].

1.1.5. Risikofaktoren und Ätiologie

Das Risiko für ein distales Magenkarzinom steigt mit dem Alter und ist bei dunkler Hautfarbe, Zugehörigkeit zu unteren sozialen Schichten sowie früher gastraler *Helicobacter-pylori*-Infektion erhöht. Das Adenokarzinom der Cardia kommt hingegen besonders bei Männern und in höheren sozialen Klassen vor, ist aber seltener *Helicobacter-pylori*-assoziiert. Wie bei Tumoren des ösophagogastralen Überganges werden gerade bei proximalen Magenkarzinomen sogenannte Wohlstandserkrankungen wie Refluxösophagitis und Adipositas als mögliche Mitursachen diskutiert. Prinzipiell gelten neben der *Helicobacter*-Infektion (laut WHO seit 1994 Klasse-I-Karzinogen) auch das Leben in Hochrisikopopulationen, Umwelt- und alimentäre Faktoren (Salz, Nitrite, Nitrosamine, Alkohol, Asbest), genetische Mutationen (5-10% der Magenkarzinome sind hereditär) und seltene Ursachen wie Zustand nach Magenteilresektion (v.a. Billroth-II-Opera-

tion) oder Bestrahlung, Ulcera, adenomatöse Polypen, M. Ménétrier sowie die chronisch-atrophe Typ-A-Gastritis als Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenkarzinoms [Hohenberger, 2003; Roukos, 2000; Dicken, 2005; Alberts, 2003; Kelley, 2003; Yao, 2000; Moehler, 2011].

1.1.6. Therapieoptionen

Chirurgische und endoskopische Therapien

Die kurativen Behandlungsoptionen eines Magenkarzinoms beschränken sich bis heute fast ausschließlich auf eine chirurgische Resektion, nur selten genügt eine rein endoskopische Abtragung (bei gut differenzierten Mukosakarzinomen). Wegen der Gefahr der intraoperativen Tumorzell-aussaat und dem damit erhöhten Risiko eines Lokalrezidivs sollte hierbei jedes Magenkarzinom möglichst durch schonende En-bloc-Resektion sowie Entfernung aller umgebenden Lymphknoten und adhärenenten Bindegewebsstrukturen (in „no-touch-Technik“) entfernt werden. Das Ausmaß der Operation (subtotale oder totale Gastrektomie mit oder ohne Splen-/Pankreatektomie, mit D1- oder D2-Dissektion) unterscheidet sich nicht nur in Abhängigkeit vom Tumorstadium, Lokalisation, Differenzierung, Histologie und Allgemeinzustand des Patienten, sondern auch in regional-gültigen Behandlungsstandards [Dicken, 2005; Roukos, 2000; Moehler, 2011].

Bei Kontraindikationen für eine R0-Resektion (s.u.) und Komplikationen wie Blutungen, Schmerzen oder Stenosen stellen beispielsweise lokale (primär nicht kurativ-intendierte) Tumorsektionen, angiographische Embolisierungen, Gastroenterostomien, perkutane Jejunostomien oder endoskopische Stentimplantationen sowie endoluminale Bestrahlungen (Brachytherapie) nützliche, palliative Therapieoptionen dar [Dicken, 2005; Roukos, 2000; Moehler, 2011].

Neoadjuvante, adjuvante und palliative (Radio-) Chemotherapien

Mit dem Nachweis von Fernmetastasen ist bei Magenkarzinompatienten eine kurative R0-Resektion in der Regel primär nicht mehr erreichbar. Daher verfolgt die Therapie fortgeschritt-

ener Tumorstadien vordergründig einen palliativen Behandlungsansatz, bei dem, je nach Allgemeinzustand des Patienten, eine systemische, meist auf 5-Fluorouracil und/oder Cisplatin basierte Chemotherapie angewendet werden kann. In mehreren Studien konnte hierdurch ein deutlicher Überlebensvorteil im Vergleich zu einer allein symptomorientierten Therapie („best supportive care“) verzeichnet werden [Leong, 2005; Sastre, 2006; Yao, 2000; Dicken, 2005; Moehler, 2011]. Aber auch nach erfolgreicher R0-Resektion bedarf es aufgrund der hohen Rezidivrate weiterer adjuvanter Therapieoptionen [Roukos, 2000; Dicken, 2005; Moehler, 2011]: Die US-Intergroup-Study INT0116 belegte beispielsweise, dass durch postoperative Radiochemotherapie (RCT) das Gesamtüberleben von Magenkarzinompatienten im Vergleich zu einer alleinigen adjuvanten Chemotherapie deutlich verlängert werden kann [Macdonald, 2001; Leong, 2005; Moehler, 2011]. Eine weitere Phase-III-Studie (UK Medical Research Council Adjuvant Gastric Cancer Infusional Chemotherapy Study - kurz „MAGIC“- Study) zeigte zudem, dass durch neoadjuvante Chemotherapie (mit Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil) das primäre Tumorstadium reduziert werden kann (sogenanntes „Downstaging“), so dass deutlich mehr Tumore einer kurativen R0-Resektion zugänglich sind, und dass durch postoperative Fortsetzung der Therapie das Gesamt- und das progressfreie Überleben signifikant verbessert werden können [Cunningham, 2006; Leong, 2005; Moehler, 2011]. Derzeit verfolgt die Behandlung fortgeschrittener Magenkarzinome ein stadienabhängiges, multimodales Therapiekonzept, das neben Radiatio und systemischer Chemotherapie auch intra- bzw. postoperative peritoneale (hypertherme) Spülchemotherapien (HIPEC) sowie Immuntherapien (z.B. VEGF- oder Her-2-Antagonisten) umfasst [Sastre, 2006; Roukos, 2000; Ng, 2007; Macdonald, 2004; Moehler, 2011].

1.1.7. Prognostische Faktoren

In mehreren Studien erwiesen sich das TNM-Stadium zum Diagnosezeitpunkt, die Tiefeninfiltration und der lokoregionäre Lymphknotenstatus (Anteil der befallenen an der Gesamtzahl der

untersuchten Lymphknoten) als prognostisch wichtige Faktoren im Magenkarzinom. Gerade die lokale Tumorausdehnung, das Vorhandensein von Fernmetastasen, der Resektionsstatus, der Umfang der Lymphknotendisektion, das histologische Grading nach Lauren, der makroskopische Typ nach Borrmann sowie die Gefäßinvasion und die Tumorlokalisation scheinen mit dem postoperativen Verlauf zu korrelieren [Kim, 2000; Dicken, 2005; Alberts, 2003; Moehler, 2011].

Fünf-Jahres-Überlebensrate

Ca. 65% aller Magenkarzinome befinden sich bei Erstdiagnose bereits in fortgeschrittenen Tumorstadien (T3/T4), nahezu 85% sind zu diesem Zeitpunkt in regionäre Lymphknoten metastasiert. Bei einer Rezidivrate von 40-65% beträgt die mittlere Überlebenszeit selbst nach kurativer Resektion (nur bei ca. 50% der Magenkarzinompatienten überhaupt erreichbar) gerade einmal 24 Monate, dagegen nur 8,1 Monate bei palliativer Therapie und 5,4 Monate ohne Behandlung. Die 5-Jahres-Überlebenschancen nach Resektion und Lymphknotendisektion liegen in Europa im Bereich von 10-30%, in Deutschland bei 27% bei den Männern und 29% bei den Frauen [Dicken, 2005; Yao, 2000; Roukos, 2000; Ng, 2007; Sastre, 2006; Moehler, 2011].

1.2. Sauerstoffhomöostase

Analog der Vogelstein-Sequenz beim kolorektalen Karzinom sind auch am Entstehungsprozess des Magenkarzinoms multiple genetische Veränderungen beteiligt. Im Laufe der progredienten Kanzerogenese treten auf zellulärer Ebene Änderungen der physiologischen Genexpression auf, so dass Tumorzellen (unter anderem) ungehindert proliferieren und dabei der Zellzykluskontrolle entgehen können. Hierbei scheint gerade die Sauerstoffversorgung innerhalb der neoplastischen Absiedlungen eine wesentliche Rolle zu spielen. Intratumorale Hypoxie und Alterationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen verändern zahlreiche Signaltransduktionswege, wobei die dabei festgestellten Expressionsveränderungen besonders Stressproteine und sauerstoffabhängig-

regulierte Gene betreffen [Semenza, 1999/2002; Zhong, 1999; Li, 2007; Yeo, 2004].

1.2.1. Hypoxie und Kanzerogenese

Eine Vielzahl humaner Malignome und besonders deren Rezidive zeigen eine im Vergleich zum Ursprungsgewebe schlechtere Sauerstoffversorgung [Hopfl, 2004]. Diese intratumorale Hypoxie führt über diverse Anpassungsvorgänge (u.a. Induktion von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen) häufig zu einer Beschleunigung des lokalen Tumorwachstums sowie der Metastasierung. Desweiteren trägt sie, neben anderen Mechanismen, zur Radio- und/oder Chemotherapieresistenz zahlreicher Neoplasien bei [Generali, 2006; Unruh, 2003; Wouters, 2008; Li, 2007]. Um diesen „Teufelskreis“ aus Hypoxie, Tumorprogression und Therapieresistenz zu durchbrechen, versuchen neue Antitumor-Therapien, malignen Zellen die Möglichkeit der Adaptation an eine Sauerstoffminderversorgung zu nehmen. Ein hierbei vielversprechender Ansatzpunkt ergibt sich aus dem Wissen einer sauerstoffabhängigen Regulation der HIF-1 α -, mTOR- und CREB-Expression [Semenza, 2002; Yeo, 2004].

mTOR (mammalian Target of Rapamycin)

Struktur und Regulation

mTOR (auch FRAP, RAPT-1 oder RAFT-1 genannt) stellt eine ubiquitär vorhandene Serin-Threonin-Proteinkinase dar, die in die Regulation diverser zellulärer Prozesse wie Nährstoffbalance, Redoxpotential, Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Proliferation involviert ist. Durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Zytokinen (wie IGF-1/2, VEGF oder PDGF (platelet-derived growth factor)) wird u.a. der sogenannte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg aktiviert, der die intrazelluläre Homöostase und den Zellzyklus maßgebend kontrolliert. mTOR kann durch Komplexbildung mit verschiedenen Proteinen zwei getrennte Signalwege aktivieren: Durch Bindung an Raptor (regulatory associated protein of mTOR) und weiteren Faktoren reguliert

mTOR - als mTORC1 - unter anderem die Translation und die Ribosomensynthese (über die ribosomale p70-S6-Kinase-1 und den eIF4E-Inhibitor 4E-BP1) sowie die Adaptation an zelluläre Hypoxie (über HIF-1 α). Zudem hemmt mTORC1 über eine Feedbackschleife die Akt-Aktivität. Demgegenüber induziert mTOR durch Bindung von unter anderem Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) - als mTORC2 - die Akt-Aktivierung (positiver Akt-Regulator) und ist in dieser zweiten Komplexformation an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt [Chiang, 2007; Wang, 2006; Thomas, 2006; Sabatini, 2006; Mita, 2003; Easton, 2006].

mTOR und Hypoxie

Während - der Schlüsselrolle von mTOR als zentralen Sensor der Nähr- und Sauerstoffbalance entsprechend - in mehreren Zellkulturuntersuchungen die mTOR-Aktivität (gemessen an der Phosphorylierung von mTOR, der p70-S6-Kinase-1 und 4E-BP1) mit zunehmender Hypoxie rasch abnahm [Arsham, 2003] und an dieser hypoxie-induzierten mTOR-Suppression auch ein HIF-1 α -abhängiges Transkript (REDD-1) beteiligt zu sein schien [Brugarolas, 2004; DeYoung, 2007], belegten andere Studien im Gegensatz dazu eine mTOR-Expressionszunahme unter sauerstoffarmen Bedingungen (gemessen an der Phosphorylierung von mTOR, der p70-S6-Kinase-1 und Akt). Diese hypoxische Induktion des mTOR-Signalweges führte zu einer Steigerung der Angiogenese, Proliferation und HIF-1-Stabilisierung [Li, 2007; Hudson, 2002; Guertin, 2007].

mTOR und Kanzerogenese

Die Tatsache, dass mTOR das Zellwachstum, die intrazelluläre Homöostase und den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus maßgeblich kontrolliert, erklärt, warum gerade eine Regulationsstörung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges zur Kanzerogenese zahlreicher humaner Tumore beitragen kann. Hierbei bislang nachgewiesene Genveränderungen betreffen in der Regel entweder Proteine, die übergeordnet selbst die mTOR-Expression steuern (wie PTEN,

PI3K, Akt, TSC1, TSC2, LKB1, REDD-1), oder aber mTOR-„Target“-Gene (wie die p70-S6-Kinase, eIF-4E oder Cyclin D1). Direkte mTOR-Mutationen sind dagegen bislang unbekannt.

1.2.2. HIF-1 α (Hypoxia inducible Factor 1 α)

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass mTOR das Tumorwachstum und die Vaskularisation humaner Magenkarzinome unter anderem durch HIF-1 α - und VEGF-abhängige Signalwege beeinflusst [Lang, 2007; Hudson, 2002; Jiang, 2001]. mTOR erhöht die HIF-1 α -Proteinexpression und seine DNA-Bindungsaktivität und induziert dadurch auch die Expression zahlreicher HIF-1 α -„Target“-Gene [Chiang, 2007; Semenza, 2002; Thomas, 2006; Zhong, 2000].

Struktur und Regulation

HIF-1 ist ein nukleares Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die beide Mitglieder der Helix-Loop-Helix-Familie der Transkriptionsfaktoren sind. Während die β -Untereinheit konstitutiv aktiv ist, existieren neben einer sauerstoffabhängigen HIF-1 α -Regulation zahlreiche weitere Mechanismen, die über die Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren, über Zytokine, Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROS), Viren und Bakterien sowie über genetische Alterationen zur HIF-1 α -Stabilisierung führen können. Hierbei spielt auch der bereits erwähnte PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle [Semenza, 2002; Yeo, 2004; Griffiths, 2005; Jiang, 2001; Hudson, 2002; Hopfl, 2004; Vivanco, 2002; Nicholson, 2002].

HIF-1 α und Hypoxie

Mehrere Studien belegen, dass die HIF-1 α -Expression mit progredienter Hypoxie rasch ansteigt und bei Reoxygenierung mit einer Halbwertszeit von unter 5 Minuten schnell wieder abfällt. Bei Normoxie kommt es nach mehreren enzymatischen HIF-1 α -Modifikationen (wie Prolin- oder Asparagin-Hydroxylierungen) zur Bindung zweier HIF-1-Repressoren, nämlich des von-Hippel-

Lindau-Tumorsuppressorproteins VHL und von FIH-1 (Factor-Inhibiting-HIF-1). In dieser ternären Komplexformation kann HIF-1 α durch eine Ubiquitin-Protein-Ligase erkannt und folglich proteasomal degradiert und inaktiviert werden [Jiang, 1996; Hopfl, 2004; Semenza, 1999/2002].

HIF-1 α und Kanzerogenese

Durch Regulation von mehr als 60 „Target“-Genen wie VEGF, Erythropoetin oder IGF-2 steuert HIF-1 α nicht nur das Zellüberleben und -wachstum, die Invasion und Metastasierung, sondern auch den Glukosestoffwechsel sowie die Angio- und Hämatogenese, und kann somit die Sauer- und Nährstoffversorgung eines Gewebes verbessern [Semenza, 1999/2002]. Eine HIF-1 α -Überexpression in humanen Malignomen korreliert dementsprechend z.B. im Magen-, Kolon- oder Pankreaskarzinom mit einer erhöhten Mortalität [Zhong, 1999; Semenza, 2007].

1.2.3. CREB (cAMP Response Element Binding Protein)

Untersuchungen zum Prostatakarzinom ergaben, dass der PI3K/Akt-Signalweg - neben mTOR und HIF-1 α - zudem die CREB-Expression maßgebend reguliert. Daher führt die Akt-Überexpression (wie bei etlichen anderen Malignomen) auch bei gastralen Tumorzellen zu einem verstärkten Nachweis von mTOR, HIF-1 α und CREB [Li, 2005; Vivanco, 2002; Nicholson, 2002].

Struktur und Regulation

CREB ist ein 43 kDa-Transkriptionsfaktor und bildet zusammen mit ATF-1 (Aktivierender Transkriptionsfaktor-1) und CREM (cAMP Response Modulator) die CREB/ATF-Unterfamilie der Leukinzipperproteine. Zahlreiche Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter können die CREB/ATF-Proteine über sekundäre Botenstoffe wie beispielsweise cAMP oder Ca²⁺ stimulieren. Dies wird über Phosphorylierung des Serinrestes 133 vermittelt, an der verschiedene Proteinkinasen - unter anderem die für die mTOR-Aktivierung verantwortliche Proteinkinase B - beteiligt sind. CREB stellt ein Konvergenzmolekül essentiell-regulativer Zellfunktionen wie

Glukosestoffwechsel, Zellproliferation, Differenzierung und Überleben dar und scheint unter anderem an neuronalen Prozessen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt zu sein [Du, 1998; Johannessen, 2004; Abramovitch, 2004; Aggarwal, 2008; Seo, 2008; Conkright, 2005].

CREB und Hypoxie

Die Untersuchung der CREB-Expression unter hypoxischen Bedingungen lieferte bislang widersprüchliche Ergebnisse: während mit fallender Sauerstoffsättigung das CREB-CRE (cAMP-Response-Element)-Bindungsvermögen durch Abnahme des zellulären cAMP-Spiegels und der PKA-Aktivität sinkt und damit die Transkription der durch CREB negativ-regulierten „Target“-Gene ansteigt [O'Reilly, 2006; Taylor, 1999], zeigen andere Studien genau den gegenteiligen Effekt, nämlich eine hypoxie-induzierte CREB-Expressions- und DNA-Bindungszunahme [Beitner-Johnson, 1998; Abramovitch, 2004]. Untersuchungen an Amphiregulin, einem EGFR-Ligand, belegen, dass CREB über einen hypoxie-sensitiven, aber HIF-1 α -unabhängigen Signaltransduktionsweg zur Epithelzellproliferation und somit möglicherweise zur Tumori-
initiation beiträgt [O'Reilly, 2006]. Da aber die CRE- und die HRE-DNA-Sequenzen (HIF-1 α -Responsive-Element) zu 80% übereinstimmen und auch CREB eine geringe Bindungsaffinität zu diesen HREs aufweist, lassen sich Überschneidungen zwischen beiden Wegen nicht ausschließen [Dimova, 2007]. Zudem benötigen HIF-1 α und CREB die gleichen Coaktivatoren CBP (CREB-Bindungs-Protein) und p300, die beispielsweise an DNA-Reparatur, Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose sowie maligner Zelltransformation beteiligt sind [Karamouzis, 2007; Wu, 2007].

CREB und Kanzerogenese

Zahlreiche Mechanismen wie Genamplifikationen, Chromosomentranslokationen, Tumorsuppressorgeninaktivierungen oder virale Onkogene können zu einer konstitutiven CREB-Aktivierung führen und Tumorzellen helfen, der Zellzyklus-Kontrolle zu entgehen. CREB kann zu un-

kontrollierter Proliferation, unlimitedem Zellüberleben und Apoptoseresistenz beitragen und durch Veränderung der Zelldifferenzierung, Neovaskularisation und Inflammation zur Onkogenese und Tumorprogression führen [Du, 1998; Conkright, 2005; Seo, 2008; Abramovitch, 2004].

1.2.4. Angiogenese

Der Begriff „Angiogenese“ beschreibt das Aussprossen bzw. die Neubildung von Blutgefäßen, ausgehend von einem bereits existenten Gefäßsystem [Hamik, 2006]. Tumorangiogenese ist ein für die Entstehung solider Tumore wichtiger Prozess, durch den ein Tumorwachstum über die Diffusionsgrenze von 1-2 mm hinaus erst möglich wird [Naumov, 2006]. Zahlreiche Studien belegen, dass der Nachweis gesteigerter Tumorangiogenese mit einer raschen Tumorprogression sowie Metastasierung gastrointestinaler Tumore verbunden ist [Reinmuth, 2003; Fidler, 1994]. Im Magenkarzinom tragen verschiedene molekulare Mechanismen zu einer erhöhten Produktion proangiogener Faktoren wie dem VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) bei. Dieser wird bei Hypoxie, Azidose, Hypoglykämie sowie bei genetischen Alterationen überexprimiert und fördert die Neovaskularisierung, begünstigt die Metastasierung verschiedener Tumor-entitäten und korreliert mit einer schlechten Prognose [Ichikura, 2001; Reinmuth, 2003]. Durch hypoxische bzw. katabole Umgebungsbedingungen kommt es gerade in schnell wachsenden Karzinomen häufig zu einer progredienten Sauerstoffmangelversorgung und daher regelmäßig zum Expressionsanstieg von Stressproteinen, welche über unterschiedliche Signalwege unter anderem die Endothelzellproliferation und Angiogenese fördern können [Li, 2007]. Hierbei kommt es neben einer HIF-1-abhängigen auch zu einer HIF-1-unabhängigen Induktion der VEGF-Produktion, an der weitere Faktoren wie CREB beteiligt sind. CREB beeinflusst die Tumovaskularisation durch Regulation der VEGF-Produktion (über eine HIF-1-abhängige Signalkaskade) sowie durch Veränderung der Expression zweier VEGF-Rezeptoren (VEGF-R1 und VEGF-R2) [Stoeltzing, 2004; Wu, 2007; Hamik, 2006; Nomura, 2006; Jeon, 2007].

2. Problemstellung und Zielsetzung

Trotz der Entwicklung zahlreicher neuer Behandlungsansätze zur Therapie des Magenkarzinoms gelang es bisher nicht, das Gesamtüberleben der Patienten signifikant zu verlängern: 2008 erkrankten weltweit ungefähr 989.000 Menschen neu, und rund 737.000 Menschen starben an den Folgen der vierthäufigsten malignen Tumorerkrankung [<http://globocan.iarc.fr/>].

Da bei einem Großteil der Magenkarzinompatienten wegen zu später Diagnosestellung und damit meist fortgeschrittener Tumorstadien eine kurative R0-Resektion nicht mehr durchführbar ist, bedarf es dringend alternativer, multimodaler Therapiekonzepte.

Durch die wachsende Kenntnis der onkogenen Signaltransduktion und molekularen Pathogenese humaner Malignome entwickelten sich in den letzten Jahren neue Behandlungsoptionen, sogenannte „Target“-spezifische Tumorthérapien, bei denen durch gezielten Angriff an zelleigenen Targets z. B. das Tumorwachstum oder die Angiogenese direkt beeinflusst werden können. Mit der Erkenntnis, dass intratumorale Hypoxie die Prognose von Karzinompatienten wesentlich beeinflusst, wuchs das Interesse an drei Signaltransduktionsmolekülen: mTOR, HIF-1 α und CREB. Da sich zeigte, dass alle drei zumindest teilweise sauerstoffabhängig reguliert werden und in bestimmten Tumorzelllinien überexprimiert werden, stellten wir die Hypothese auf, dass mTOR, HIF-1 α und CREB eine entscheidende Rolle in der Magenkarzinomprogression spielen und nützliche Targets in der Antitumor-Therapie darstellen könnten.

In dieser Studie untersuchten wir, ob die phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression mit ausgewählten, klinisch-pathologischen Parametern der Tumorpatienten bzw. untereinander korrelierten und analysierten deren Einfluß auf Angiogenese (über die CD31-/CD105-Expression) und Lymphknotenmetastasierung sowie den postoperativen Krankheitsverlauf (Rezidiv, Überleben, Todesursache) und die Prognose (rezidivfreies und Gesamtüberleben) von Magenkarzinompatienten.

3. Material und Methoden

3.1. Gewebeproben

3.1.1. Herkunft und Art der Proben

Die vorliegende, retrospektiv durchgeführte Studie schließt 76 Magenkarzinompatienten ein, die zwischen den Jahren 1993 und 2000 in der Chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg operiert wurden. Repräsentative Tumor- und Lymphknotengewebeblöcke wurden vom Institut für Pathologie des Hauses zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Befunderhebung und Datensammlung

Für die statistische Auswertung wurden klinische Daten sowie pathologische Befunde gesichtet und Angaben zum Tumor-Staging (TNM-Klassifikation von 1997), zur Lokalisation und zur histologischen Klassifikation erneut geprüft. In Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum Regensburg/Ostbayern konnten wir zudem den poststationären Verlauf (Rezidiv, Überleben, Todesursache) verfolgen.

3.1.3. Klinisch-pathologische Aspekte

Tab.3-1. zeigt klinisch-pathologische Aspekte der 76 Patienten, darunter 47 Männer und 29 Frauen im Alter von 41 bis 90 Jahren (Geschlecht, Alter, TNM-Stadien, Resektionsstatus, Tumorlokalisation, Tumordifferenzierung, postoperativer Verlauf). Entsprechend der Lauren-Klassifikation enthielt das Kollektiv 35 Adenokarzinome des intestinalen und 35 Adenokarzinome des diffusen Typs. Bei sechs Tumoren handelte es sich histologisch um Mischtumore, bei zwei Patienten zeigte sich makroskopisch ein Anastomosen-Karzinom nach früherer Billroth-II-Operation. Die Trennung in „unter vs. über 50-Jährige“ sollte eine Hilfestellung geben, um zwischen familiären und sporadischen Magenkarzinomformen differenzieren zu können.

		Intestinaler Typ (n=35)	Diffuser Typ (n=35)	Mischtyp (n=6)	Gesamt (n=76)
Geschlecht	weiblich	12 (34,3%)	15 (42,9%)	2 (33,3%)	29 (38,1%)
	männlich	23 (65,7%)	20 (57,1%)	4 (66,7%)	47 (61,8%)
Alter	< 50 Jahre	2 (5,7%)	5 (14,3%)	1 (16,7%)	8 (10,5%)
	> 50 Jahre	33 (94,3%)	30 (85,7%)	5 (83,3%)	68 (89,5%)
T-Stadium	T1	5 (14,3%)	2 (5,7%)		7 (9,2%)
	T2	11 (31,4%)	7 (20,0%)	3 (50,0%)	21 (27,6%)
	T3	16 (45,7%)	23 (65,7%)	2 (33,3%)	41 (53,9%)
	T4	3 (8,6%)	3 (8,6%)		6 (7,9%)
	Tx			1 (16,7%)	1 (1,3%)
N-Stadium	N0	10 (28,6%)	5 (14,3%)	4 (66,7%)	19 (25,0%)
	N1	13 (37,1%)	8 (22,8%)		21 (27,6%)
	N2	7 (20,0%)	17 (48,6%)		24 (31,6%)
	N3	5 (14,3%)	5 (14,3%)	1 (16,7%)	11 (14,5%)
	Nx			1 (16,7%)	1 (1,3%)
M-Stadium	M0	9 (25,7%)	13 (37,1%)	1 (16,7%)	23 (30,3%)
	M1	14 (40,0%)	11 (31,4%)	2 (33,3%)	27 (35,5%)
	Mx	12 (34,2%)	11 (31,4%)	3 (50,0%)	26 (34,2%)
R-Status	R0	29 (82,9%)	27 (77,1%)	5 (83,3%)	61 (80,3%)
	R1	4 (11,4%)	5 (14,3%)		9 (11,8%)
	R2	2 (5,7%)	3 (8,6%)		5 (6,6%)
	Rx			1 (16,7%)	1 (1,3%)
Lokalisation	Cardia	9 (25,7%)	6 (17,1%)		15 (19,7%)
	Corpus	8 (22,9%)	17 (48,6%)	4 (66,7%)	29 (38,1%)
	Antrum	18 (51,4%)	9 (25,7%)	1 (16,7%)	28 (36,9%)
	Anastom.		1 (2,9%)	1 (16,7%)	2 (2,6%)
	unbekannt		2 (5,7%)		2 (2,6%)
Grading	G1	3 (8,6%)			3 (3,9%)
	G2	15 (42,9%)	2 (5,7%)	1 (16,7%)	18 (23,7%)
	G3	17 (48,6%)	33 (94,3%)	4 (66,7%)	54 (71,0%)
	Gx			1 (16,7%)	1 (1,3%)
Postop. Verlauf	Rezidiv	3 (8,6%)	7 (20,0%)	1 (16,7%)	11 (14,5%)
	Lebend	10 (28,6%)	7 (20,0%)		17 (22,3%)
	Verstorben	24 (68,6%)	27 (77,1%)	6 (100%)	57 (75,0%)
	unbekannt	1 (2,9%)	1 (2,9%)		2 (2,6%)

Tab.3-1. Klinisch-pathologische Aspekte des untersuchten Patientenkollektivs

3.1.4. Postoperativer Verlauf: Rezidivstatus und Gesamtüberleben

Anhand der Überarbeitung der Krankenhausakten der Patienten und der Informationen des lokalen Tumorzentrums verfolgten wir den postoperativen Verlauf bis 2007. Das Gesamt-Follow-up der 17 Überlebenden (22%) betrug im Mittel 88,9 Monate (72 – 127 Monate), 57 Patienten (75%) starben nach durchschnittlich 22,4 Monaten (9 Tage - 80 Monate). Die mittlere Gesamtüberlebenszeit betrug somit 37,7 Monate. 11 Patienten zeigten im Mittel nach 13,9 Monaten (4 - 41 Monate) ein Tumorrezidiv (siehe Tab.3-1.).

3.2. Immunhistochemische Färbungen

3.2.1. Monoklonale Antikörper

Die Expressionen von phosphoryliertem mTOR bzw. CREB, von HIF-1 α sowie von CD31 und CD105 wurden immunhistochemisch (IHC) mittels aufgelisteter Antikörper detektiert (siehe Tab.3-2.). Bei allen Färbedurchläufen wurden stets Positivkontrollen an Gewebeschnitten mit bekannter Antigen-Expression sowie Negativkontrollen durch Weglassen der jeweiligen primären Antikörper durchgeführt.

Herstellerbezeichnung	Isotyp	Hersteller
Phospho-CREB (Ser133)	Kaninchen mAb	Cell Signaling Technologies
Phospho-mTOR (Ser2448)	Kaninchen mAb	Cell Signaling Technologies
Anti-HIF-1 α (H1alpha67)	Maus mAb; IgG2b	Novus Biologicals
Anti-CD105 (Endoglin)	Maus mAb; Klon: SN6h	Dako Cytomation
Anti-CD31 (PECAM)	Maus mAb; Klon: JC60A	Dako Cytomation

Tab.3-2. Bei der Immunhistochemie verwendete primäre (monoklonale) Antikörper

3.2.2. Immunohistochemische Färbung von mTOR und CREB

Zum spezifischen Nachweis von aktiviertem mTOR bzw. CREB wurden 4-5 μ m dicke, formalin-fixierte und paraffineingebettete Gewebeschnitte der Primärtumore und der Lymphknoten-

metastasen verwendet, deren Antigenbindungsstellen, nach Trocknung, Entparaffinierung (Xylol) und Hydrierung mittels absteigender Alkoholreihe [100, 95, 90, 70 und 50% Ethanol/ddH₂O (v/v)], durch Kochen mit Citratpuffer (pH 6.0) freigesetzt wurden. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase (mit 3%-iger Hydrogenperoxidlösung) und Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung (Kollagene, Proteine) durch Pferdeserum erfolgte die Inkubation mit einer 1:50-Verdünnung der monoklonalen, gegen phosphoryliertes mTOR bzw. phosphoryliertes CREB gerichteten Antikörper (s.o.).

Unter Verwendung eines sekundären, biotinylierten Antikörpers sowie der ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Komplex) des Vectastain Universal Elite ABC Kits konnte die phospho-mTOR- bzw. phospho-CREB-Expression nach Inkubation mit DAB (Diaminobenzidin) in Form eines braunen Präzipitates visualisiert werden. Abschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Aquatex eingedeckelt.

3.2.3. Immunohistochemische Färbung von HIF-1 α

Erstes Färbe-Protokoll

Der Nachweis der HIF-1 α -Expression erfolgte zunächst ähnlich dem mTOR-/CREB-Färbeprotokoll mit Hilfe eines Vectastain ABC Kits unter Verwendung einer 1:50-Verdünnung des primären Antikörpers Anti-HIF-1 α , aber mit einem Avidin-Biotin-Ziegenserum-Kit, einem Fab-Fragment (Ziegen-Anti-Maus-IgG) sowie mit Ziegen-Anti-Maus-IgG2b als sekundären, Biotinkonjugierten Antikörper. Die HIF-1 α -Expression wurde schließlich mittels ABC-Alkalischer-Phosphatase-Lösung, NBT/BCIP (s.u.) und Levamisole (s.u.) sowie abschließender Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red (s.u.) detektiert.

Problematik

Da trotz des hohen Antikörperbedarfs (1:50-Verdünnung) und langer Inkubationszeiten meist nur

schwache HIF-1 α -Präzipitate erzielt werden konnten und die Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red die Zellmembranen nicht klar abgrenzte (siehe Herstellerangaben, dort vorbeschrieben), werteten wir diese Färbemethodik als uneffizient (vgl. Abb.3-1.). Trotz Protokollabwandlungen, Internet-Recherchen und Rücksprache mit Beratern von Vector Laboratories gelang es nicht, dieses Verfahren entscheidend zu verbessern.

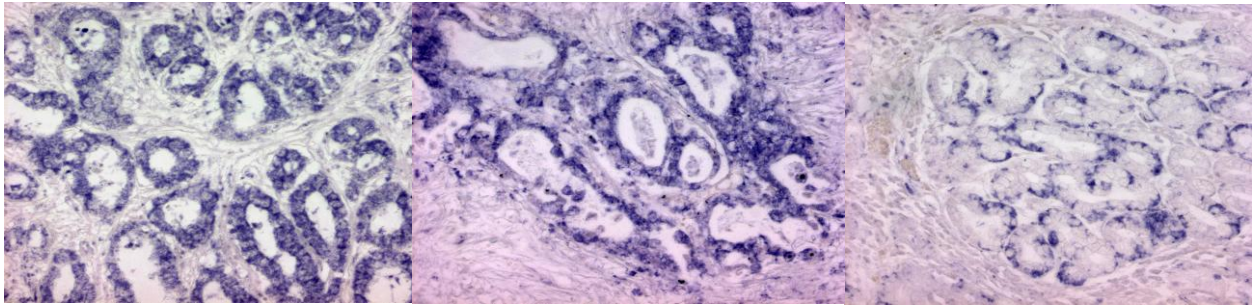


Abb.3-1. HIF-1 α -Nachweis mit der Avidin-Biotin-Methode (Vectastain ABC Kit)

Zweites Färbeprotokoll

Wir etablierten daher ein neues Protokoll: die verbesserte immunohistochemische HIF-1 α -Detektion basierte hierbei auf der Formierung eines „Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Komplexes“ mit Hilfe eines CSA-Kits (Katalysiertes Signal-Amplifikation-System) von Dako Cytomation, bei dem Signale über die Avidin-Biotin- und Peroxidase-Methodik verstärkt werden. Nach Trocknung, Entparaffinierung, Rehydratation und Antigendemaskierung (Citrat-Puffer, pH 6.0) wurden - vor Verwendung des 1:500 verdünnten monoklonalen Anti-HIF-1 α - die endogene Peroxidase mittels 3%-igem Hydrogenperoxid und unspezifische Bindungen durch Proteinlösung blockiert. Nach Inkubation mit biotinyliertem sekundärem Antikörper, mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, mit Amplifikationsreagenz (biotinyliertes Tyramin und Hydrogenperoxid) und mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase konnten schließlich die Antigenbindungsstellen durch DAB visualisiert werden (Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Eindeckelung mit Aquatex).

3.2.4. Immunhistochemische Analyse der Tumervaskularisation

Zur Analyse der Tumervaskularisation benutzten wir immunohistochemische Färbungen für CD31 (PECAM: platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) und CD105 (Endoglin) - zwei Antigene, die auf Endothelzellen kleiner Gefäße exprimiert werden und Anhaltspunkte für die Gefäßdichte in Neoplasien liefern. Dafür verwendeten wir - analog zu HIF-1 α - jeweils einen CSA-Kit (s.o.). Bei der CD31-Färbung erfolgte die Antigenmaskierung mit TRS-Puffer („Target Retrieval Solution“, modifizierter Citratpuffer, p.H. 9.0), die Blockierung mit einem Gemisch aus 10% Ziegenserum und 1% BSA („Bovine Serum Albumin“, Proteinlösung), die Antigenbindung mit einer 1:500-Verdünnung des primären Antikörpers und mit Anti-Maus-Antikörper (1:50) als sekundären Antikörper. Die Visualisierung erfolgte mit Fast Red (s.u.) sowie Hämatoxylin als Gegenfärbung. Bei der CD105-Färbung benutzten wir eine 1:500-Verdünnung von Anti-CD105.

3.3. Verwendete Materialien

- Primäre Antikörper: siehe Tab.3-2.
- Sekundäre Antikörper:
 - HIF-1 α : Ziege-Anti-Maus IgG2b (Biotin-konjugiert), Santa Cruz Biotechnology, Cat. Sc-2074, L2804
 - mTOR/CREB, CD31/CD105: im Kit bereits enthalten
- Dako CSA-Kit: Katalysiertes Signal-Amplifikation-System, Dako Cytomation
- Vectastain Universal Elite ABC Kit: Vector Laboratories, Cat. PK-620, Burlingame, CA
- Vectastain ABC Kit: Vector Laboratories, Cat. AK-5000, Burlingame, CA
- Avidin/Biotin-Blocking-Kit: Vector Laboratories, Cat. SP-20, Burlingame, CA
- AffiniPure Fab Fragment Ziegen Anti-Maus IgG (H+L): Jackson ImmunoResearch Laboratories
- BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, Roche Diagnostics GmbH Mannheim
- NBT: 4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid, Roche Diagnostics GmbH Mannheim

- Levamisole: Vector Laboratories, SP-5000, S0411, Burlingame, CA
- Nuclear Fast Red: Sigma-Aldrich®
- TRS-Puffer: „Target Retrieval Solution“, Dako Cytomation
- DAB-Tabletten: Diaminobenzidin Puffertabletten, Merck-KGaA
- Ziegen-Serum: Vector Laboratories Normal Goat Serum, Cat. S-1000, Burlingame, CA

3.4. Spezifische Auswertung und Score-Methodik

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen - geordnet nach Lokalisation (nuklear oder zytoplasmatisch), Ausmaß und Intensität der Expression - erfolgte durch zwei unabhängige Pathologen. Jeder Schnitt wurde erst bei niedriger (40x) und dann bei hoher Vergrößerung (100x) betrachtet. Unterschiede bei der Beurteilung wurden nochmals an einem Konferenzmikroskop diskutiert. Neben den Tumorzellen wurden auch die Färbeeigenschaften von Stroma-Zellen, Gefäßen, Gallengängen, Lymphozyten, glatten Muskel- und gesunden Epithelzellen bewertet.

Als Maß für die phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression bestimmten wir semiquantitativ einen Score, der sich durch die Multiplikation der Punkte aus dem Prozentsatz der positiv gefärbten Tumorzellen (0-25% = 1 Punkt, 26-50% = 2 Punkte, 51-75% = 3 Punkte, 76-100% = 4 Punkte) und der Färbeintensität (schwach = 1 Punkt, mittel = 2 Punkte, stark = 3 Punkte) errechnen ließ. Anhand dieses Scores (Produkt aus Positivität und Intensität) erfolgte die Einteilung in vier Gruppen (kategorisiert als 0, 1, 2 oder 3): negative Expression (Score: 0) für die errechneten Produkte 0-3, schwache Expression (Score: 1) für die Produkte 4-6, mittlere Expression (Score: 2) für die Produkte 7-9 und starke Expression (Score: 3) für die Produkte 10-12. Für die Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern und dem postoperativen Verlauf benutzten wir eine Dichotomisierung, bei der die Tumorschnitte entweder als negativ ("0") bei Score 0 oder als positiv ("1") bei Score 1, 2 oder 3 betrachtet wurden.

Für die Analyse der Tumervaskularisation bestimmte ein von den IHC-Färbungen unabhängiger Untersucher lichtmikroskopisch (200-fache Vergrößerung) die Anzahl der CD31-/CD105-positiven Gefäße (pro Gesichtsfeld) in jeweils sechs verschiedenen, gefäßreichen Tumorbezirken (2x Zentrum, 2x Rand und 2x Invasionsfront des Tumors) und errechnete hieraus Mittelwerte (MW) bzw. Mediane (MVC: Mean Vessel Count). Anhand des jeweiligen Mittelwertes bzw. Medians erfolgte schließlich die Einteilung in stark und niedrig vaskularisierte Tumore.

3.5. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung wurde von Frau Dr. K. Thelen (Klinik für Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg) unterstützt. Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS Release 15.0.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) durchgeführt. Korrelationen zwischen der Expression von phospho-mTOR, HIF-1 α , phospho-CREB, CD31 oder CD105 und den klinisch-pathologischen Parametern der Magenkarzinome sowie dem postoperativen Patientenüberleben wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson analysiert. Aktuelle Informationen zum Follow-up lagen bei 74 der 76 Patienten (97,4 %) vor. Das Gesamtüberleben wurde definiert als der Zeitraum zwischen Operation bis zum Todestag. Patienten, die bei Beendigung der Studie noch am Leben waren, wurden anhand der letzten Nachsorgeuntersuchung erfasst. Das rezidivfreie Intervall (RFI) wurde festgelegt als Zeitraum zwischen Operation und dem ersten Nachweis eines Rezidivs. Zur Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit und der Gesamtüberlebenszeit aller Patienten benutzte man die Methode nach Kaplan-Meier und bestimmte statistische Signifikanzen mittels log-rank-Test. Korrelationen zwischen den phospho-mTOR-, HIF-1 α -, phospho-CREB-, CD31- und CD105-Expressionen wurden über die Spearman's Rang-Korrelation errechnet. Bei allen Tests galt ein $p < 0,05$ als signifikant. Alle erhaltenen p 's sind das Ergebnis von zweiseitigen Tests.

4. Ergebnisse

4.1. Immunhistochemie

Abb.4-1. bis 4-3. zeigen mikrofotographische Ablichtungen immunhistochemischer Färbungen von phospho-mTOR, HIF-1 α und phospho-CREB in Magenkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen, geordnet nach histologischem Typ (Lauren) und Nodalstatus (N0 vs. N1-3). Bei N0-Tumoren wurden stichprobenartig Färbungen an tumorfreien Lymphknoten durchgeführt.

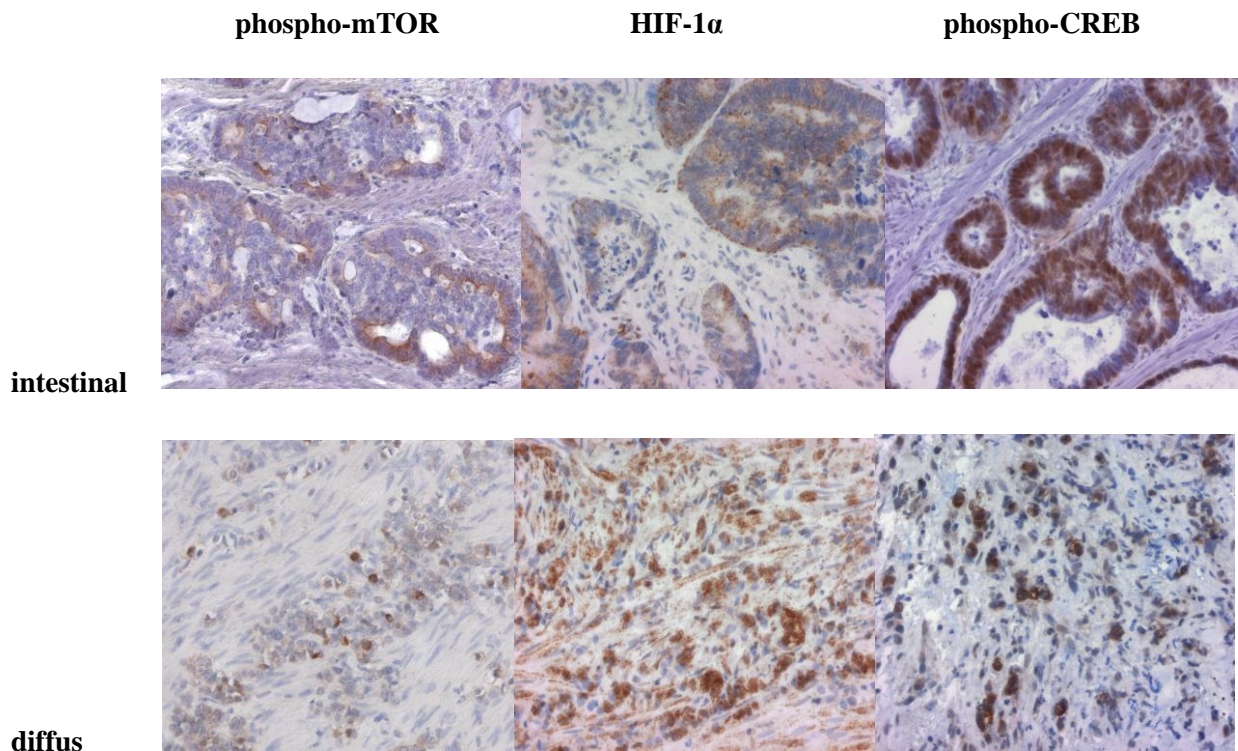


Abb.4-1. phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression in intestinalen (1.Reihe) und diffusen (2.Reihe) N0-Magenkarzinomen

Neben den Karzinomzellen mit meist deutlicher (nuklearer oder zytoplasmatischer) phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression zeigten z.T. auch Schleimhautareale am Tumorinvasionsrand eine moderate Expression der drei Marker. Dieser Randeffekt spiegelt die

beginnende, maligne Transformation der umliegenden Mukosa durch Veränderung der physiologischen Gentranskription im Rahmen der hypoxischen Stressantwort wieder [Hui, 2002].

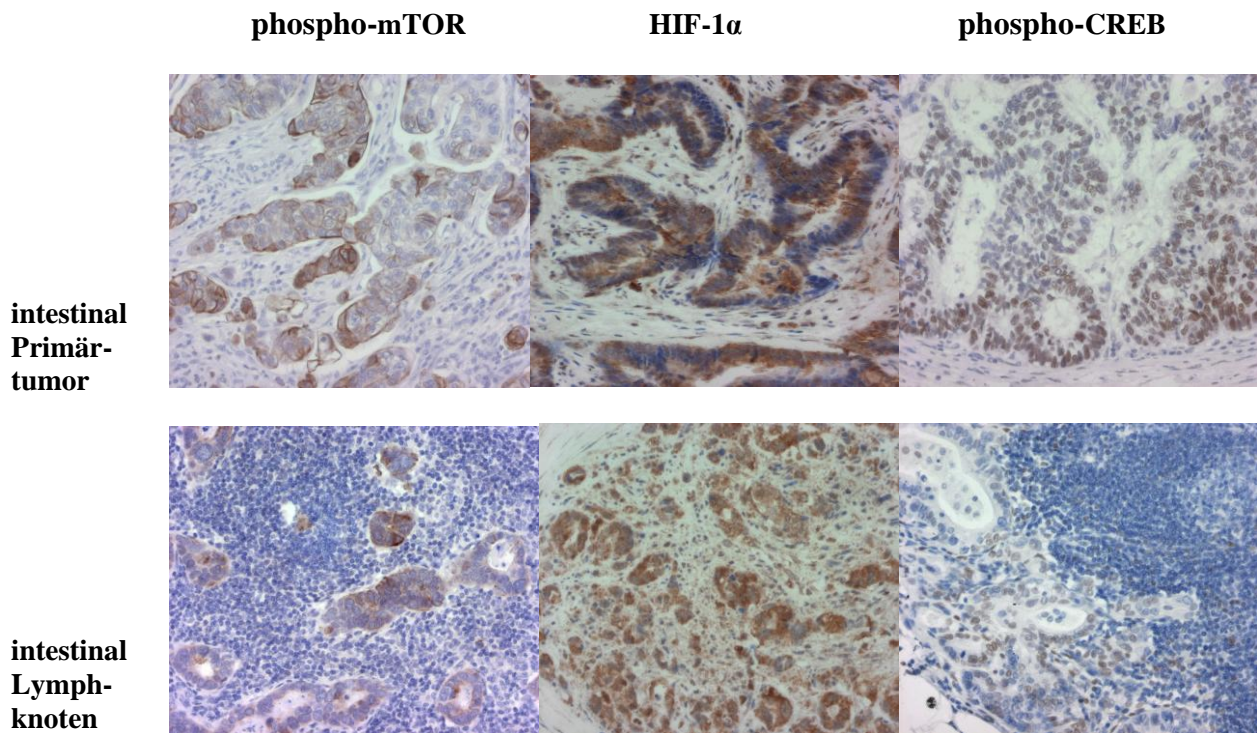


Abb.4-2. phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression in intestinalen Magenkarzinomen (N1-3) (1. Reihe) und deren Lymphknotenmetastasen (2. Reihe)

phospho-mTOR-Färbung

In den immunhistochemischen Färbungen wurde die phospho-mTOR-Expression über ein intensiv braunes, streng zytoplasmatisch lokalisiertes Präzipitat detektiert: dieses fand sich nicht nur in den Magenkarzinomzellen, sondern zu einem geringen Prozentsatz auch in nekrotischen oder ulcerösen Schleimhautarealen, Lymphozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen. Durch den positiven Nachweis im Bereich von Lymphgefäßeinbrüchen könnte mTOR (wie auch CREB und HIF-1 α) auch als Marker einer Lymphangiosis carcinomatosa (siehe Abb.4-4.) dienen. Zudem wurde mTOR in den Gallengangsepithelien der wenigen mituntersuchten Lebermetastasen exprimiert (100% Expression bei 3 von 5 untersuchten Gewebeschnitten).

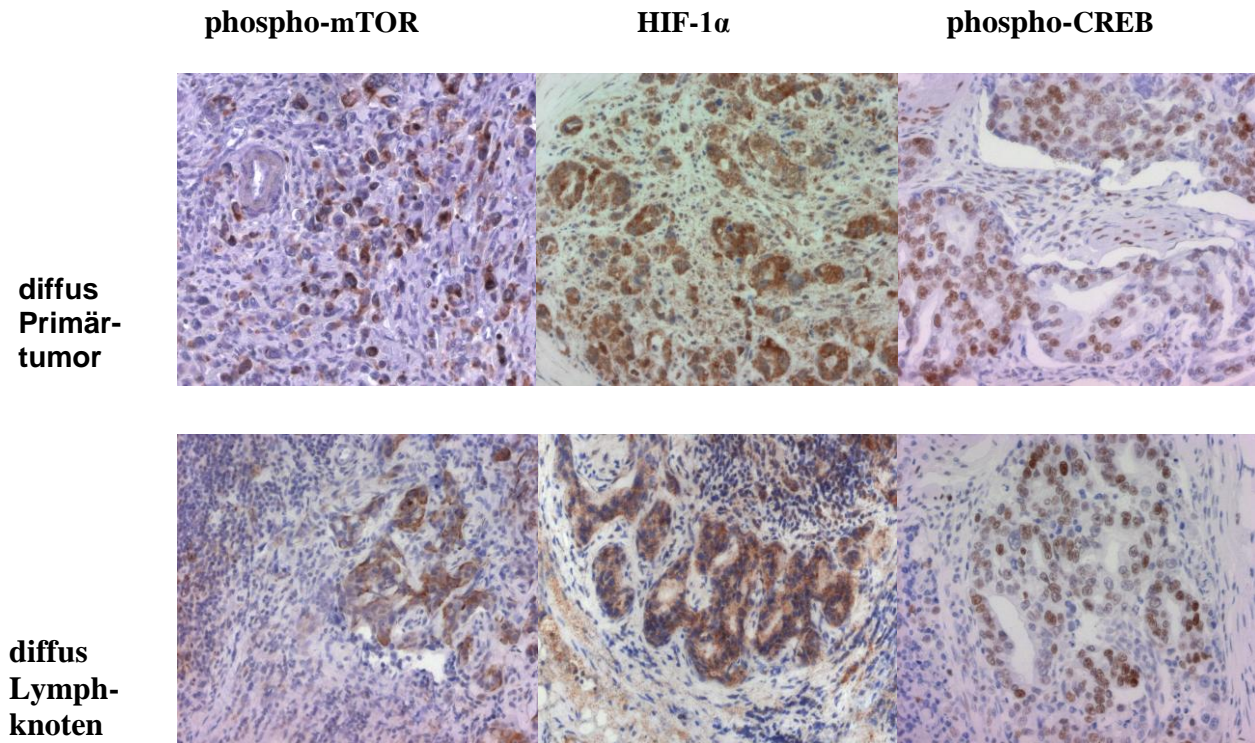


Abb.4-3. phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression in diffusen Magenkarzinomen (N1-3) (1. Reihe) und deren Lymphknotenmetastasen (2. Reihe)

Insgesamt waren 39 (52%) der 75 (98,7%) gewerteten Primärtumore (phospho-mTOR-Färbung bei einem Tumor nicht wertbar) phospho-mTOR-negativ und 36 (48%) phospho-mTOR-positiv; davon zeigten 20 (55%) eine schwache, 15 (42%) eine moderate und einer (3%) eine starke phospho-mTOR-Expression. Von 59 (77,6%) gewerteten Lymphknotenmetastasen waren 27 (46%) phospho-mTOR-negativ und 32 (54%) phospho-mTOR-positiv, wobei 14 (44%) phospho-mTOR nur schwach, 8 (25%) moderat und 10 (31%) stark exprimierten.

HIF-1 α -Färbung

Das Protein HIF-1 α kann in malignen Zellen sowohl zytoplasmatisch, als auch nuklear lokalisiert sein. Als Ursache hierfür wird vermutet, dass HIF-1 α vor seiner nuklearen Translokation im Sinne einer vermehrten Proteinstabilisierung zunächst im Zytoplasma akkumuliert [Stroka, 2001; Qui, 2008]. In den meisten unserer immunhistochemischen Färbungen zeigte sich HIF-1 α als

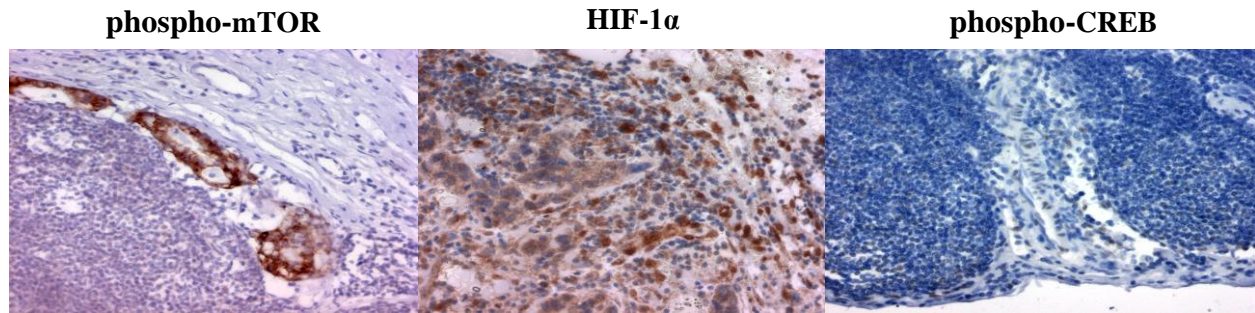


Abb.4-4. phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression in Lymphgefäßen der Lymphknotenmetastasen (Lymphangiosis carcinomatosa)

zytoplasmatisches Präzipitat, nur in wenigen Gewebeschnitten (8,1%, 6 von 74) als nuklear lokalisierter Transkriptionsfaktor. Vergleichbar der phospho-mTOR Expression konnte HIF-1 α nicht nur im Zentrum der Tumore, sondern auch an deren Invasionsfront, in angrenzenden Nekrosezonen, in Schleimhautulcera, in glatten Muskelzellen und in Lymphozyten (v.a. in inflammatorischen und desmoplastischen Zonen) sowie teilweise in Endothelzellen kleiner Gefäße und in Gallengängen (bei 3 von 5 untersuchten Lebermetastasen) nachgewiesen werden [Hui, 2002; Stroka, 2001] (siehe Abb.4-4 und Abb.4-5.).

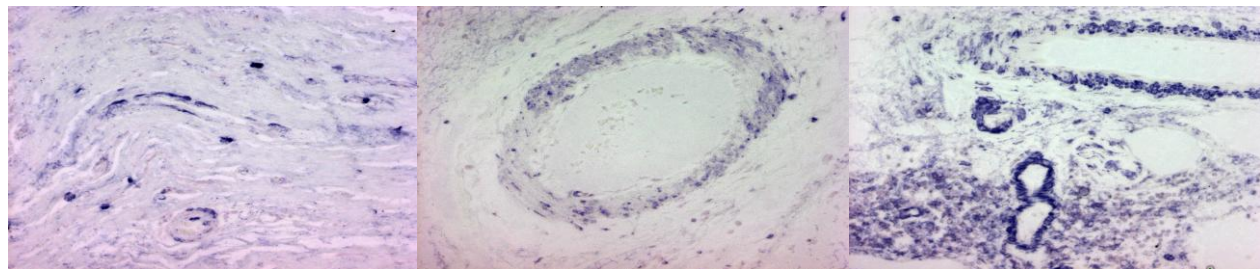


Abb.4-5. HIF-1 α -Expression in Endothelzellen von Magenkarzinomen

Bezogen auf die zytoplasmatische HIF-1 α -Expression waren insgesamt 45 (61,6%) der 73 (96,1%) gewerteten Primärtumore (HIF-1 α -Färbung bei 3 Tumoren nicht wertbar) HIF-1 α -negativ und 28 (38,4%) HIF-1 α -positiv: 17 (61%) davon zeigten eine schwache, 9 (32%) eine moderate und 2 (7%) eine starke HIF-1 α -Färbung. Von den wenigen Tumoren mit nuklearem Präzipitat (8,2%, n=6) exprimierten 4 (66,7%) HIF-1 α schwach und 2 (33,3%) stark. Unter den

58 gewerteten Lymphknotenmetastasen waren 30 (52%) zytoplasmatisch HIF-1 α -negativ und 28 (48%) zytoplasmatisch HIF-1 α -positiv: davon 16 (57,1%) schwach und je 6 (21,4%) moderat bzw. stark. Von den 4 Lymphknotenmetastasen (6,9%) mit nuklearem Nachweis exprimierten je einer (25%) HIF-1 α schwach bzw. moderat und 2 (50%) stark.

phospho-CREB-Färbung

Auch phospho-CREB konnte immunhistochemisch (analog zu phospho-mTOR und HIF-1 α) nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in glatten Muskelzellen, Nekrosen, Ulcera, an der Tumorinvasionsfront sowie - bei Lymphknotenmetastasen - in Lymphozyten und Gefäßendothelien und - bei Lebermetastasen - in Gallengangsepithelien (4 von 5 zu 100% phospho-CREB-positiv) nachgewiesen werden (siehe Abb.4-6.). Das phospho-CREB-Präzipitat wurde dabei stets nuklear lokalisiert.

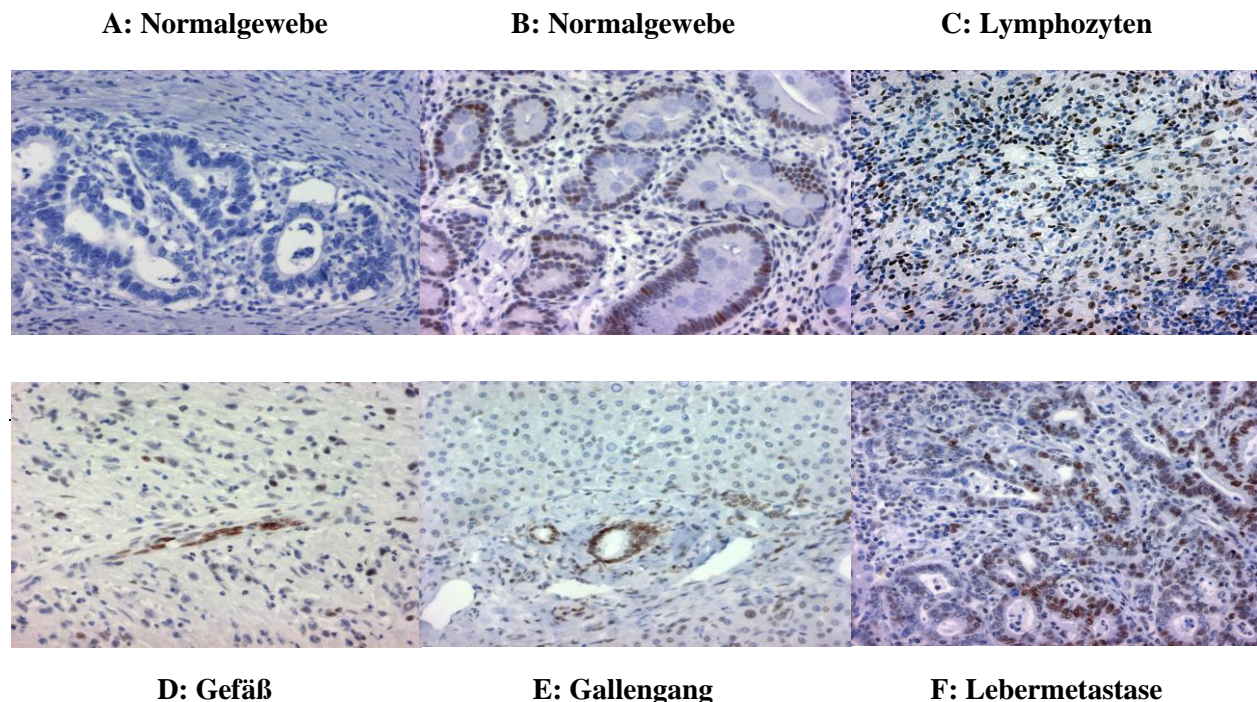


Abb.4-6. phospho-CREB-Expression im Normalgewebe (A: CREB negativ, B: CREB positiv), in Lymphozyten (C), Gefäßen (D), Gallengängen (E) und Lebermetastasen (F)

Von 74 gewerteten Tumoren (97,3 %; phospho-CREB-Färbung bei einem Tumor nicht wertbar) waren 54 (73%) phospho-CREB-negativ und 20 (27%) phospho-CREB-positiv (davon 12 (60%) schwach, 4 (20%) moderat und 4 (20%) stark). Von 59 gewerteten Lymphknotenmetastasen waren 43 (73%) phospho-CREB-negativ und 16 (27%) phospho-CREB-positiv (11 (69%) schwach, 2 (12%) moderat und 3 (19%) stark).

CD31- und CD105-Färbung

Die Tumervaskularisierung wurde in dieser Studie anhand des Nachweises der Endothelzellantigene CD31 und CD105 in den Primärtumoren untersucht. Abb.4-7. zeigt entsprechende repräsentative immunhistochemische Färbungen. In der CD31-Analyse zeigten sich im Mittel 19 Gefäße am Tumorrand (Spannbreite: 3-43, Median: 17), 18 Gefäße im Tumorzentrum (5-41, Median: 16,5) und 18 Gefäße an der Invasionsfront (5-59, Median: 16). Bezogen auf den MVC des Gesamttumors (18 Gefäße, Spannbreite: 6-38, Median: 16) waren 31 (53,4%) der gewerteten

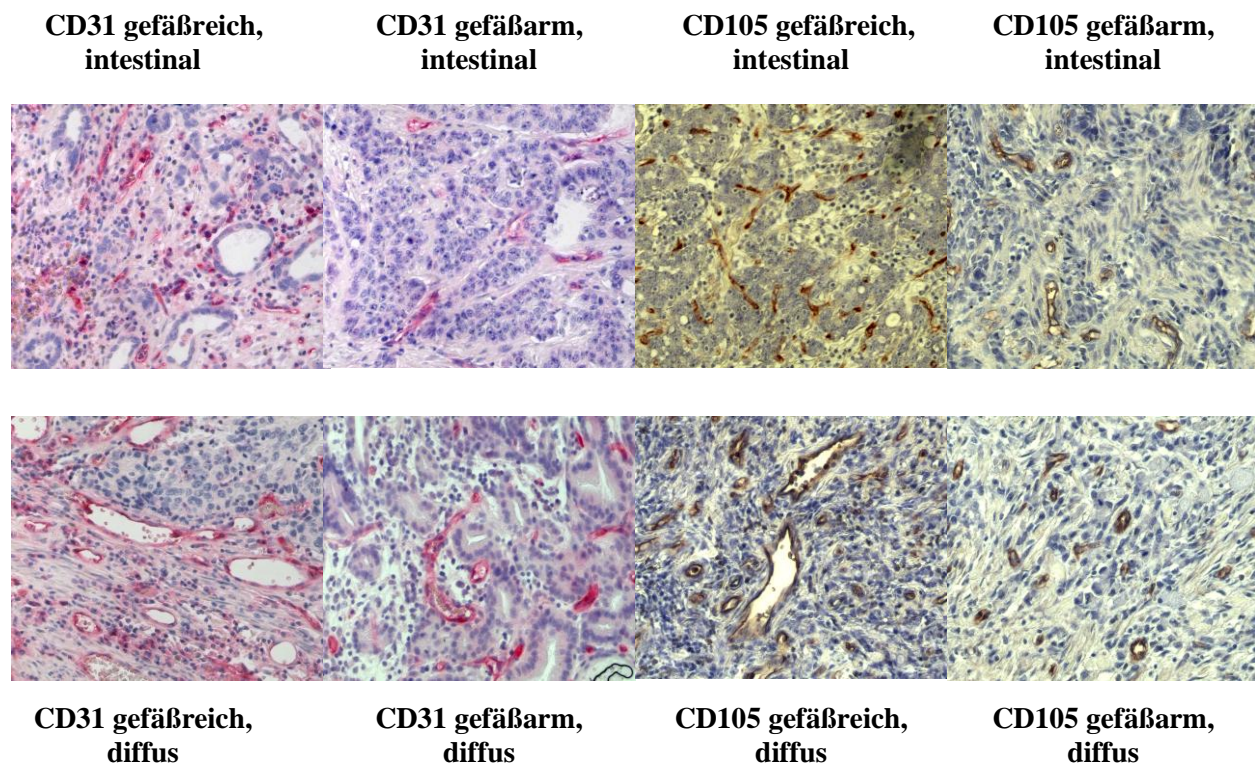


Abb.4-7. CD31- und CD105-Expression in intestinalen (1. Reihe) und diffusen Magenkarzinomen (2. Reihe)

58 Magentumore (76,3%, CD31-Färbung bei 18 Primärtumoren nicht verwertbar) niedrig und 27 (46,6%) stark vaskularisiert (bezogen auf den Median waren 26 (44,8%) gefäßarm und 32 (55,2%) gefäßreich).

Analog dazu konnten für CD105 im Mittel 19 Gefäße (6-39, Median: 17) am Tumorrand, 20 Gefäße (9-49, Median: 18,5) im Tumorzentrum, 18 Gefäße (7-37, Median: 17) an der Invasionsfront und 19 Gefäße (10-35, Median: 18,5) für den Gesamttumor ermittelt werden, so dass sich jeweils 50% (36 von 72) der gewerteten Tumore (94,7%, CD105-Färbung bei 4 Primärtumoren nicht verwertbar) als hoch- bzw. niedrig vaskularisiert darstellten.

4.2. mTOR-Analysen

phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren und klinisch-pathologische Parameter

Tab.4-1. fasst die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen der phospho-mTOR-Expression in Magenkarzinomzellen und ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern zusammen. Demnach korrelieren weder der histologische Typ nach Lauren (intestinal vs. diffus), die lokale Tumorausdehnung (T-Stadium nach TNM) oder die Fernmetastasierung (M-Stadium nach TNM), noch die Tumordifferenzierung (Grading), der Resektionsstatus (R) oder das Alter (unter vs. über 50 Jahre) mit der phospho-mTOR-Expression im Primärtumor bei Magenkarzinompatienten. Obwohl sich in der statistischen Auswertung keine Korrelation zwischen dem Lymphknotenmetastasierungsstadium (N-Stadium nach TNM) und der phospho-mTOR-Expression der Primärtumore nachweisen lässt ($p=0,100$), zeigt die Einzelanalyse der unterschiedlichen Nodalstadien (N0-3), dass eine positive phospho-mTOR-Expression im Primärtumor signifikant mit einer fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasierung, nämlich dem N3-Stadium (vs. allen anderen N-Stadien), korreliert ($p=0,015$): 81,8% der N3-Tumorschnitte waren phospho-mTOR-positiv (siehe Abb.4-8.).

	phospho-mTOR (Primärtumor)		phospho-mTOR (Lk-Metastasen)	
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test
Histolog. Typ	76 (100%)	p=0,556	59 (77,6%)	p=0,929
T-Stadium	75 (98,7%)	p=0,592	59 (77,6%)	p=0,352
N-Stadium	75 (98,7%)	p=0,100	59 (77,6%)	p=0,088
M-Stadium	50 (65,8%)	p=0,982	43 (56,6%)	p=0,771
R-Status	75 (98,7%)	p=0,389	59 (77,6%)	p=0,019
Grading	75 (98,7%)	p=0,693	59 (77,6%)	p=0,111
Lokalisation	74 (97,4%)	p=0,075	57 (75,0%)	p=0,686
Altersgruppe	76 (100%)	p=0,555	59 (77,6%)	p=0,205

Tab.4-1. Übersicht d. Korrelationsanalysen der phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit klinisch-patholog. Parametern

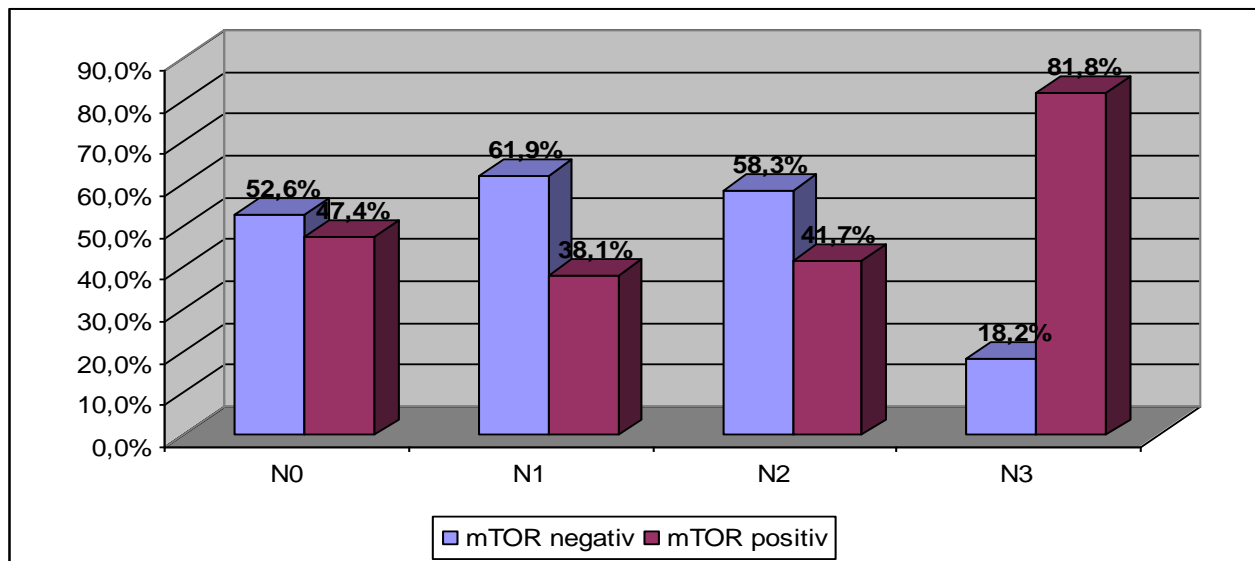


Abb.4-8. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren mit dem N-Stadium

phospho-mTOR-Expression in den Lymphknotenmetastasen und klinisch-pathologische Parameter

Tab.4-1. zeigt auch die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen der phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen und klinisch-pathologischen Parametern. Wie bei den

Primärtumoren findet sich auch hier keine Korrelation zwischen der phospho-mTOR-Expression und dem histologischen Typ, dem T- oder M-Stadium, der Tumorlokalisation sowie dem Alter der Patienten. Es zeigt sich jedoch erneut der Trend einer bei positiver phospho-mTOR-Expression häufig fortgeschritteneren Lymphknotenmetastasierung (höheres N-Stadium) ($p=0,088$) (siehe Abb.4-9.). Hinsichtlich der Tumorzelldifferenzierung (Grading) fällt auf, dass alle untersuchten Lymphknotenmetastasen stets von mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren (G2 und G3) abstammten, was verdeutlicht, dass das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung mit der Entdifferenzierung des Primärtumors ansteigt. Unter den G2-Tumoren waren 35,7%, unter den G3-Tumoren 60,0% der Lymphknotenmetastasen phospho-mTOR-positiv. Statistisch bestätigt sich der Trend, dass eine positive phospho-mTOR-Expression in Lymphknotenmetastasen von Magenkarzinompatienten mit einer schlechten Tumorzelldifferenzierung im Primarius korreliert ($p=0,111$). Desweiteren stellte man fest, dass phospho-mTOR gehäuft in Lymphknotenmetastasen der Tumore nachgewiesen werden kann, bei denen keine kurative Tumorresektion durchgeführt werden konnte (also R1- oder R2-Operationen) ($p=0,019$).

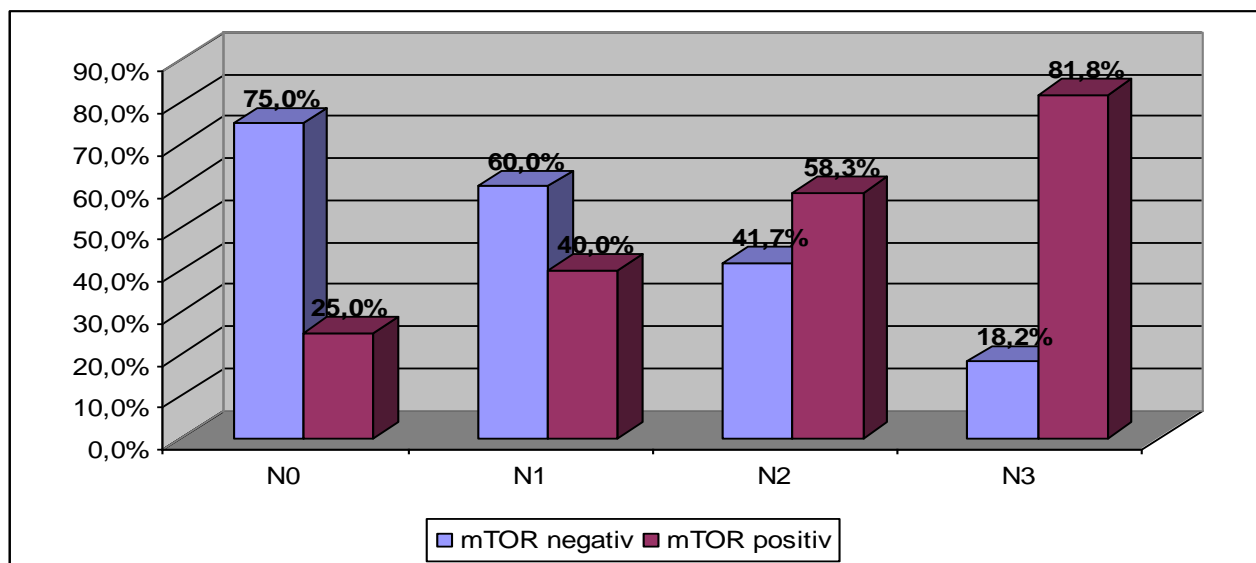


Abb.4-9. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem N-Stadium

phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren / den Lymphknotenmetastasen und postoperativer Verlauf

Die Analyse der Daten der Nachsorgeuntersuchungen und des regionalen Tumorzentrums zeigt, dass die phospho-mTOR-Expression im Primärtumor weder mit den Tumorrezidiven (ohne vs. mit Rezidiv), noch dem Gesamtüberleben (lebend vs. tot) oder der Todesursache (Tod tumorbedingt oder anderweitige zu Tode führende Erkrankung) korreliert (siehe Tab.4-2.). Auch die phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen steht in keinem Zusammenhang mit der Tumorrezidivhäufigkeit. Das Gesamtüberleben der Magenkarzinompatienten korreliert jedoch nahezu signifikant mit der phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen ($p=0,053$) (siehe Abb.4-10.). Bei den Überlebenden wurde phospho-mTOR in 27,3% der Fälle, bei den Verstorbenen bei 59,6% nachgewiesen. Überlebende zeigten somit seltener eine positive phospho-mTOR-Expression (27,3%) als Patienten, die am Tumor (55,6%) oder an anderen Ursachen (75%) verstarben ($p=0,070$).

	phospho-mTOR (Primärtumor)		phospho-mTOR (Lk-Metastasen)	
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test
Tumorrezidiv	73 (96,1%)	$p=0,634$	58 (76,3%)	$p=0,387$
Überleben	74 (97,4%)	$p=0,482$	58 (76,3%)	$p=0,053$
Todesursache	76 (100%)	$p=0,526$	59 (77,6%)	$p=0,070$

Tab.4-2. Übersicht d. Korrelationsanalysen der phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit dem postoperativen Verlauf

phospho-mTOR-Expression im Magenkarzinom - Fazit:

Die Untersuchung der Primärtumore und der Lymphknotenmetastasen zeigt eine Häufung fortgeschrittenerer Lymphknotenmetastasierungen (N-Stadium nach TNM) bei positiver phospho-mTOR-Expression (nicht signifikant). Ferner besteht eine nahezu signifikante

Korrelation zwischen der phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen und dem Gesamtüberleben der Magenkarzinompatienten (weniger Überlebende bei positiver nodaler phospho-mTOR-Expression).

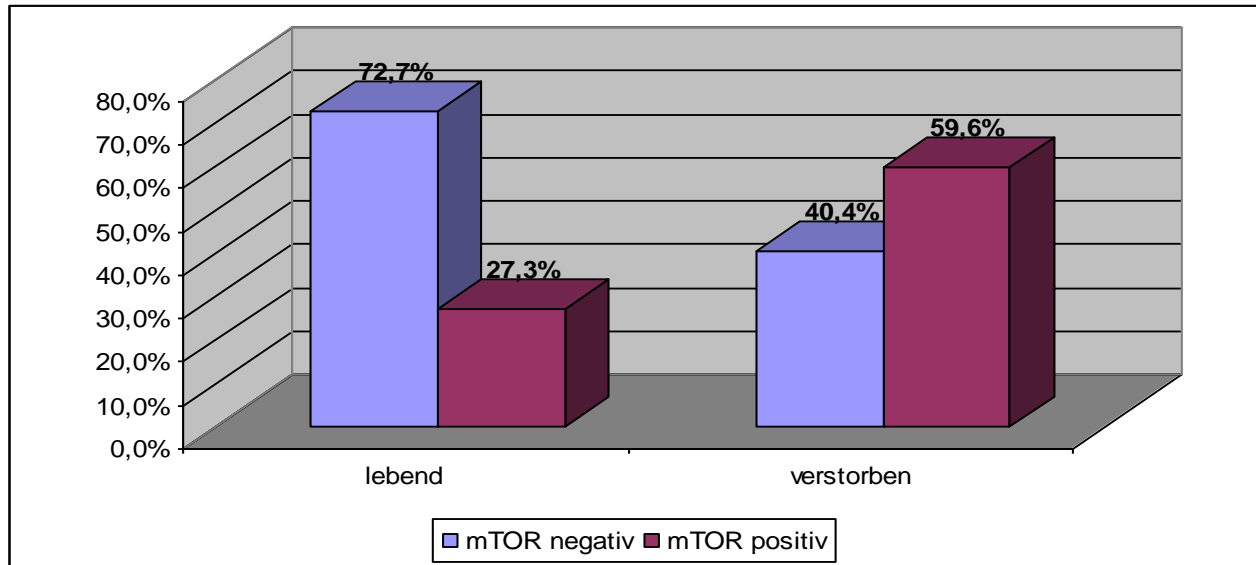


Abb.4-10. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem Gesamtüberleben

4.3. HIF-1 α -Analysen

Zytoplasmatische HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren und klinisch-pathologische Parameter

Tab.4-3. stellt die Ergebnisse aller Chi-Quadrat-Tests zwischen den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern und der zytoplasmatischen HIF-1 α -Expression im Primärtumor dar. Diese korreliert signifikant mit einer schlechten Tumorzelldifferenzierung ($p=0,005$) (siehe Abb.4-11.).

Nukleare HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren und klinisch-pathologische Parameter

Wie aus Tab.4-3. ersichtlich, besteht eine jeweils signifikante Korrelation zwischen der nuklearen HIF-1 α -Expression und dem positiven Nachweis von Lymphknotenmetastasen ($p=0,045$), aber

auch dem Fehlen von Fernmetastasen ($p=0,021$). Hierbei zeigt sich eine HIF-1 α -Überexpression in N2-Tumoren (20,8%) und in M0-Tumoren (18,2%).

	HIF-1 α Zytoplasma		HIF-1 α Nuklear
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Chi-Quadrat-Test
Histologischer Typ	74 (97,4%)	$p=0,190$	$p=0,325$
T-Stadium	73 (96,1%)	$p=0,109$	$p=0,536$
N-Stadium	73 (96,1%)	$p=0,407$	$p=0,045$
M-Stadium	49 (64,5%)	$p=0,386$	$p=0,021$
R-Status	73 (96,1%)	$p=0,568$	$p=0,759$
Grading	73 (96,1%)	$p=0,005$	$p=0,775$
Lokalisation	72 (94,7%)	$p=0,108$	$p=0,858$
Altersgruppe	74 (97,4%)	$p=0,983$	$p=0,630$

Tab.4-3. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren mit klinisch-pathologischen Parametern

Zytoplasmatische und nukleare HIF-1 α -Expression in den Lymphknotenmetastasen und klinisch-pathologische Parameter

Tab.4-4. fasst die Ergebnisse der Korrelationstests der HIF-1 α -Expression der Lymphknotenmetastasen zusammen. Dabei zeigt die zytoplasmatische HIF-1 α -Expression der Lymphknotenmetastasen einen Trend zur Korrelation mit dem T-Stadium ($p=0,082$), die nukleare HIF-1 α -Expression den einer Korrelation mit dem M-Stadium (M1-Tumore: 13% positiv) ($p=0,086$).

Zytoplasmatische und nukleare HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren / den Lymphknotenmetastasen und postoperativer Verlauf

Wie Tab.4-5. und 4-6. zeigen, konnten im untersuchten Kollektiv keine Korrelationen zwischen der zytoplasmatischen oder nuklearen HIF-1 α -Expression der Primärtumore oder der Lymphknotenmetastasen und den Tumorrezidiven, dem Gesamtüberleben oder der Todesursache (tumorbedingter Tod vs. andere zu Tode führende Erkrankung) festgestellt werden.

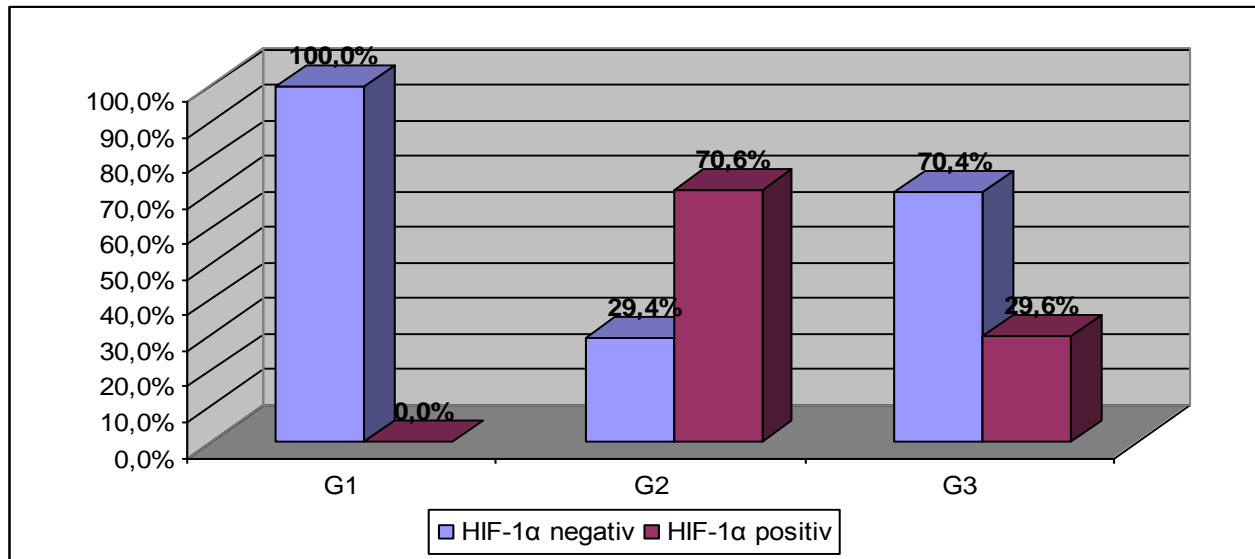


Abb.4-11. Korrelation der zytoplasmatischen HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren mit der Differenzierung (Grading)

	HIF-1 α Zytoplasma		HIF-1 α Nuklear
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Chi-Quadrat-Test
Histologischer Typ	58 (76,3%)	p=0,276	p=0,922
T-Stadium	58 (76,3%)	p=0,082	p=0,419
N-Stadium	58 (76,3%)	p=0,386	p=0,401
M-Stadium	43 (56,6%)	p=0,853	p=0,086
R-Status	58 (76,3%)	p=0,221	p=0,128
Grading	58 (76,3%)	p=0,893	p=0,295
Lokalisation	56 (73,7%)	p=0,203	p=0,942
Altersgruppe	58 (76,3%)	p=0,916	p=0,412

Tab.4-4. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1 α -Expression in den Lymphknoten-metastasen mit klinisch-pathologischen Parametern

HIF-1 α -Expression im Magenkarzinom - Fazit:

Die zytoplasmatische HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren der Magenkarzinompatienten korreliert signifikant mit einer schlechten Tumorzelldifferenzierung (Grading), die nukleare HIF-1 α -Expression der Primärtumore signifikant mit einem höheren Lymphknotenmetastasierungsstadium, aber auch mit noch fehlender Fernmetastasierung (M0-Stadium).

	HIF-1 α Zytoplasma		HIF-1 α Nuklear
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Chi-Quadrat-Test
Tumorrezidiv	71 (93,4%)	p=0,902	p=0,207
Gesamtüberleben	72 (94,7%)	p=0,330	p=0,189
Todesursache	74 (97,4%)	p=0,306	p=0,369

Tab.4-5. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1 α -Expression in den Primärtumoren mit dem postoperativen Verlauf

	HIF-1 α Zytoplasma		HIF-1 α Nuklear
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Chi-Quadrat-Test
Tumorrezidiv	57 (75,0%)	p=0,848	p=0,344
Gesamtüberleben	57 (75,0%)	p=0,226	p=0,670
Todesursache	58 (76,3%)	p=0,440	p=0,852

Tab.4-6. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1 α -Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem postoperativen Verlauf

4.4. CREB-Analysen

phospho-CREB-Expression in den Primärtumoren und klinisch-pathologische Parameter

Wie aus Tab.4-7. (linke Hälfte) ersichtlich, korreliert keiner der untersuchten klinisch-pathologischen Parameter mit der phospho-CREB-Expression der Primärtumore von Magenkarzinompatienten. Die Betrachtung des Resektionsstatus zeigt jedoch, dass phospho-CREB häufiger in R1- (55,6%) und R2-resezierten Tumoren (40%) als in kurativ-operierten Karzinomen (R0, 21,7%) exprimiert wird (p=0,081).

phospho-CREB-Expression in den Lymphknotenmetastasen und klinisch-pathologische Parameter

Tab.4-7. (rechte Hälfte) präsentiert zudem die Ergebnisse der Chi-Quadrat-Tests der Lymphknotenmetastasen. Unter diesen fallen zwei hoch signifikante Korrelationen zwischen der

phospho-CREB-Expression der Lymphknotenmetastasen und 1.: der lokalen Tumorausdehnung (T-Stadium nach TNM) der Primärtumore ($p<0,001$; siehe Abb.4-12.) sowie 2.: dem Resektionsstatus des Primarius ($p=0,002$) auf.

	phospho-CREB (Primärtumor)		phospho-CREB (Lk-Metastasen)	
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test
Histolog. Typ	75 (98,7%)	$p=0,291$	59 (77,6%)	$p=0,623$
T-Stadium	74 (97,4%)	$p=0,461$	59 (77,6%)	$p<0,001$
N-Stadium	74 (97,4%)	$p=0,384$	59 (77,6%)	$p=0,485$
M-Stadium	49 (64,5%)	$p=0,280$	42 (55,3%)	$p=0,266$
R-Status	74 (97,4%)	$p=0,081$	59 (77,6%)	$p=0,002$
Grading	74 (97,4%)	$p=0,520$	59 (77,6%)	$p=0,583$
Lokalisation	73 (96,1%)	$p=0,558$	57 (75,0%)	$p=0,587$
Altersgruppe	75 (98,7%)	$p=0,463$	59 (77,6%)	$p=0,416$

Tab.4-7. Übersicht d. Korrelationsanalysen der phospho-CREB-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit klinisch-patholog. Parametern

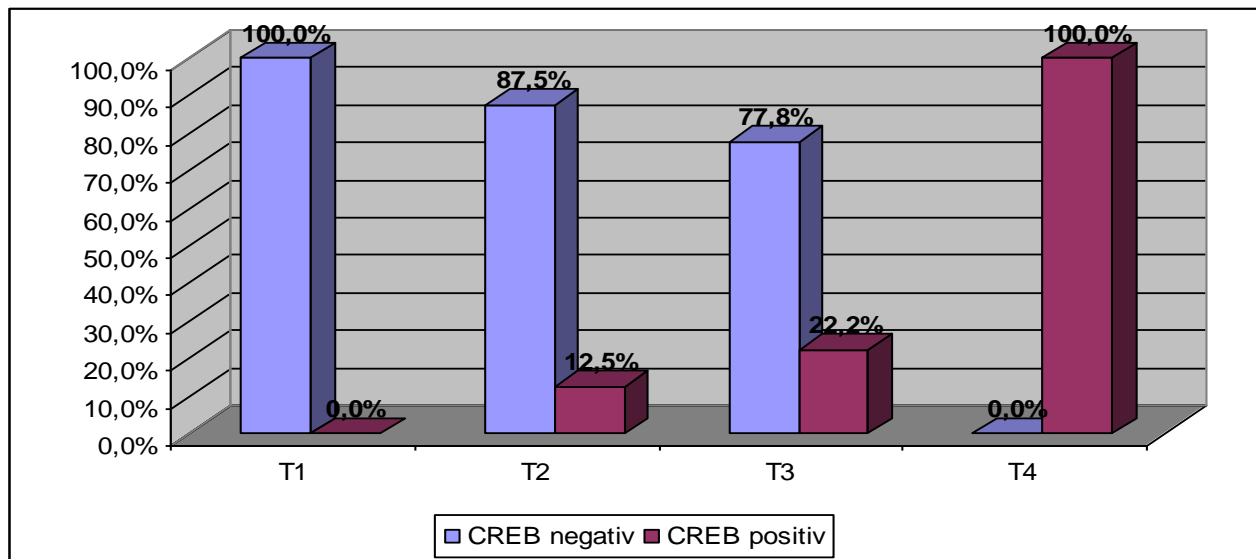


Abb.4-12. Korrelation der phospho-CREB-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem T-Stadium

phospho-CREB-Expression in den Primärtumoren / den Lymphknotenmetastasen und postoperativer Verlauf

Wie Tab.4-8. zeigt, besteht keine Korrelation zwischen der phospho-CREB-Expression der Primärtumore oder der Lymphknotenmetastasen und dem postoperativen Verlauf der Magenkarzinompatienten.

	phospho-CREB (Primärtumor)		phospho-CREB (Lk-Metastasen)	
Parameter	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test	Gültige Fälle	Chi-Quadrat-Test
Tumorrezidiv	72 (94,7%)	p=0,155	57 (75,0%)	p=0,927
Überleben	73 (96,1%)	p=0,832	58 (76,3%)	p=0,642
Todesursache	75 (98,7%)	p=0,142	59 (77,6%)	p=0,782

Tab.4-8. Übersicht d. Korrelationsanalysen der phospho-CREB-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit dem postoperativen Verlauf

phospho-CREB-Expression im Magenkarzinom - Fazit:

Eine positive phospho-CREB-Expression in den Lymphknotenmetastasen korreliert signifikant mit einer lokal-fortgeschrittenen Tumorausdehnung (T-Stadium) sowie dem Resektionsausmaß (R-Status).

4.5. Analysen zur Tumolvaskularisation

CD31 bzw. CD105-Expression und klinisch-pathologische Parameter

Tab.4-9. zeigt die Ergebnisse der Analyse der Tumolvaskularisation der Primärtumore, die, gemessen an der CD31-Expression (Median), signifikant mit dem N-Stadium korreliert (p=0,037). Diese Korrelation bestätigt unsere Behauptung, dass bei gesteigerter Tumolvaskularisation Magenkarzinome früher bzw. häufiger in regionäre Lymphknoten metastasieren können (siehe Abb.4-13.). Gemessen an der CD105-Expression korreliert die Gefäßanzahl (MVC) signifikant

($p=0,009$) mit dem Grading. Tumorzellen gefäßreicher Magenkarzinome sind demnach häufiger entdifferenziert (siehe Abb.4-14.).

	CD31 Mittelwert	CD31 Median	CD105 Mittelwert	CD105 Median
Parameter	Chi-Quadrat	Chi-Quadrat	Chi-Quadrat	Chi-Quadrat
Histologischer Typ	$p=0,177$	$p=0,303$	$p=0,261$	$p=0,261$
T-Stadium	$p=0,305$	$p=0,371$	$p=0,239$	$p=0,239$
N-Stadium	$p=0,236$	$p=0,037$	$p=0,849$	$p=0,849$
M-Stadium	$p=0,400$	$p=0,279$	$p=0,143$	$p=0,143$
R-Status	$p=0,965$	$p=0,687$	$p=0,716$	$p=0,716$
Grading	$p=0,853$	$p=0,604$	$p=0,009$	$p=0,009$
Lokalisation	$p=0,459$	$p=0,388$	$p=0,448$	$p=0,448$
Altersgruppe	$p=0,858$	$p=0,550$	$p=1,000$	$p=1,000$

Tab.4-9. Übersicht der Korrelationsanalysen der CD31-/105-Expression in den Primärtumoren mit klinisch-pathologischen Parametern

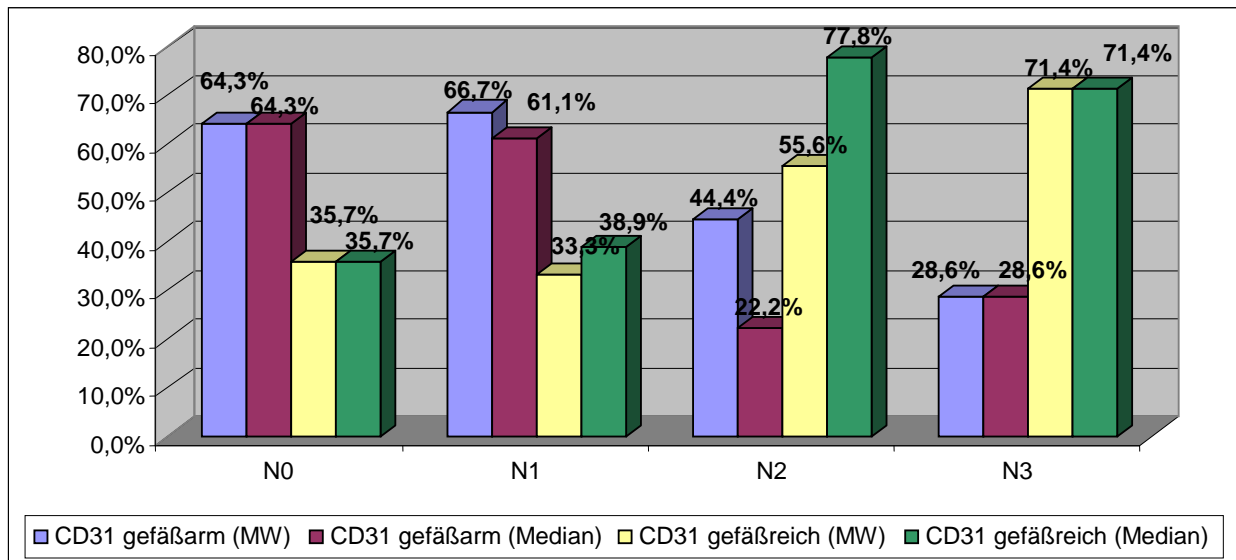


Abb.4-13. Korrelation der CD31-Expression in den Primärtumoren mit dem N-Stadium

CD31 bzw. CD105-Expression und postoperativer Verlauf

Wie in Tab. 4-10. dargestellt, korreliert weder die CD31- noch die CD105-Expression mit den

Tumorrezidiven, dem postoperativen Gesamtüberleben oder der Todesursache (Tod tumorbedingt oder andere letale Erkrankung).

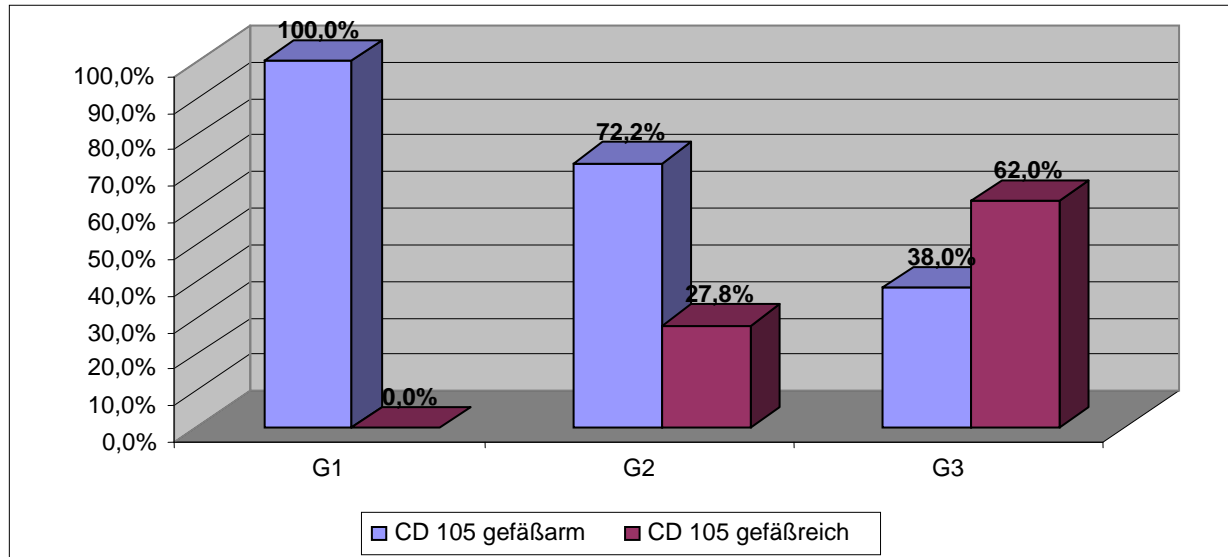


Abb.4-14. Korrelation der CD105-Expression in den Primärtumoren mit dem Grading

	CD31 Mittelwert	CD31 Median	CD105 Mittelwert	CD105 Median
Parameter	Chi-Quadrat	Chi-Quadrat	Chi-Quadrat	Chi-Quadrat
Tumorrezidiv	p=0,478	P=0,612	p=0,782	p=0,782
Gesamtüberleben	p=0,865	P=0,784	p=0,780	p=0,780
Todesursache	p=0,942	P=0,876	p=0,754	p=0,754

Tab.4-10. Übersicht der Korrelationsanalysen der CD31-/105-Expression in den Primärtumoren mit dem postoperativen Verlauf

CD31/CD105-Expression im Magenkarzinom - Fazit:

Eine hohe Gefäßdichte im Primärtumor von Magenkarzinompatienten korreliert, gemessen an CD31, mit einem höheren Lymphknotenmetastasierungsstadium (N-Stadium) sowie, gemessen an CD105, mit einer schlechteren Tumorzellendifferenzierung (Grading).

4.6. „Survival“-Analysen zum rezidivfreien und zum Gesamtüberleben

Um der Frage nachzugehen, welche Faktoren die postoperative Prognose von Magenkarzinompatienten maßgebend beeinflussen, analysierten wir die Daten des Tumorzentrums und der Nachsorge unter Anwendung der Kaplan-Meier-Methode, und suchten mit Hilfe des log-rank-Tests nach wichtigen Prognosemarkern. Dazu verglichen wir das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben mit jeweils der phospho-mTOR-, HIF-1 α -, phospho-CREB-, CD31- und CD105-Expression sowie mit den TNM-Stadien, dem histologischen Typ nach Lauren und dem Grading. Da sich in den Chi-Quadrat-Tests zeigte, dass die HIF-1 α - und die phospho-CREB-Expression der Lymphknotenmetastasen nicht mit dem postoperativen Verlauf korrelierten (siehe Kap 4.3. und 4.4.), wurden im Folgenden nur deren Primärtumor-Expressionen weiter analysiert.

4.6.1. Rezidivfreies Überleben

Wie aus Tab.4-11. (Kaplan-Meier-Analyse) ersichtlich, korrelieren weder mTOR, HIF-1 α (Zyto/Kern) und CREB, noch die Gefäßversorgung (gemessen am CD31-/ CD105-Mittelwert), das T-, N- oder M-Stadium, die Tumorzelldifferenzierung oder der histologische Typ signifikant mit dem rezidivfreien Intervall (RFI). Obwohl sich belegen ließ, dass das rezidivfreie Überleben bei Magenkarzinompatienten im Falle eines positiven phospho-mTOR-Nachweises im Primärtumor oder in den Lymphknotenmetastasen durchschnittlich kürzer verlief als bei negativem, sollte die phospho-mTOR-Expression aufgrund fehlender Signifikanz im log-rank-Test nicht zur Abschätzung der Rezidivwahrscheinlichkeit genutzt werden.

		Rezidivfreies Überleben		Gesamtüberleben	
		Mittelwert/ Median; 95%-KI; Spannweite	log-rank	Mittelwert/ Median; 95%-KI; Spannweite	log-rank
p-mTOR Tumor	mTOR neg	37,9/21,5;	p=0,623	39,2/21,5;	p=0,543
		26,3-49,4; 1-120		27,9-50,4; 1-120	
	mTOR pos	34,1/17,0;		36,1/18,5;	
		22,5-45,8; 0-127		24,7-47,6; 9d-127 Mo	
p-mTOR Lk	mTOR neg	41,0/31,0;	p=0,293	42,7/31,0;	p=0,049
		27,3-54,7; 1-100		28,7-56,7; 1-100	
	mTOR pos	25,5/14,0;		27,7/16,0;	
		14,8-36,1; 0-127		17,1-38,3; 9d-127 Mo	
HIF-1α (Zyto) Tumor	HIF-1 neg	37,4/21,5;	p=0,845	39,2/23,0;	p=0,229
		27,2-47,5; 0-127		29,2-49,2; 0-127	
	HIF-1 pos	29,2/12,0;		30,5/16,0;	
		16,5-41,8; 1-100		18,2-42,9; 1-100	
HIF-1α (Kern) Tumor	HIF-1 neg	34,4/19,0;	p=0,240	35,9/19,5;	p=0,689
		26,1-42,6; 0-127		27,8-44,1; 0-127	
	HIF-1 pos	33,2/30,0;		36,0/36,0;	
		1,4-65,0; 2-67		6,8-65,2; 2-67	
p-CREB Tumor	CREB neg	37,1/21,0;	p=0,136	38,3/21,0;	p=0,839
		27,7-46,4; 1-120		29,1-47,4; 1-120	
	CREB pos	34,6/16,5;		37,4/18,5;	
		17,0-52,2; 0-127		20,1-54,6; 0-127	
CD31 (MW) Tumor	Gefäßarm	35,8/19,5;	p=0,440	37,1/21,0;	p=0,943
		22,4-49,1; 0-92		24,5-49,7; 0-92	
	Gefäßreich	37,6/22,0;		38,5/22,0;	
		23,3-52,9; 2-127		24,3-52,7; 2-127	
CD105(MW) Tumor	Gefäßarm	40,8/21,0;	p=0,971	42,9/30,0;	p=0,449
		28,1-53,6; 1-127		30,5-55,3; 1-127	
	Gefäßreich	33,6/18,0;		34,9/19,0;	
		22,3-44,9; 0-100		23,8-46,1; 0-100	
T-Stadium		-	p=0,073	-	p<0,001
N-Stadium		-	p=0,719	-	p=0,004
M-Stadium		-	p=0,523	-	p=0,386
Grading		-	p=0,531	-	p=0,055
Histologie		-	p=0,127	-	p=0,612

Tab.4-11. Korrelationen zwischen p-mTOR, HIF-1α, p-CREB, CD31,CD105 sowie klinisch-pathologischen Parametern mit dem rezidivfreien und dem Gesamtüberleben

(univariate Analyse unter Anwendung des log-rank-Tests, MW = Mittelwert, KI = Konfidenzintervall)

4.6.2. Gesamtüberleben

„Survival“-Analysen zeigten ein bei positiver phospho-mTOR-, phospho-CREB- oder zyttoplasmatischer HIF-1 α -Expression sowie bei - gemessen an CD105 - hoher Tumervaskularisation durchschnittlich kürzeres Gesamtüberleben als bei negativem Nachweis bzw. gefäßarmen Tumoren. Die phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen erreichte hierbei sogar das Signifikanzniveau ($p=0,049$, log-rank-Test) und kann somit künftig bei Magenkarzinompatienten als Prognosemarker genutzt werden (siehe Abb.4-15.). Demgegenüber waren der nukleare HIF-1 α -Nachweis und eine - an CD31 gemessen - hohe Gefäßdichte gehäuft mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert.

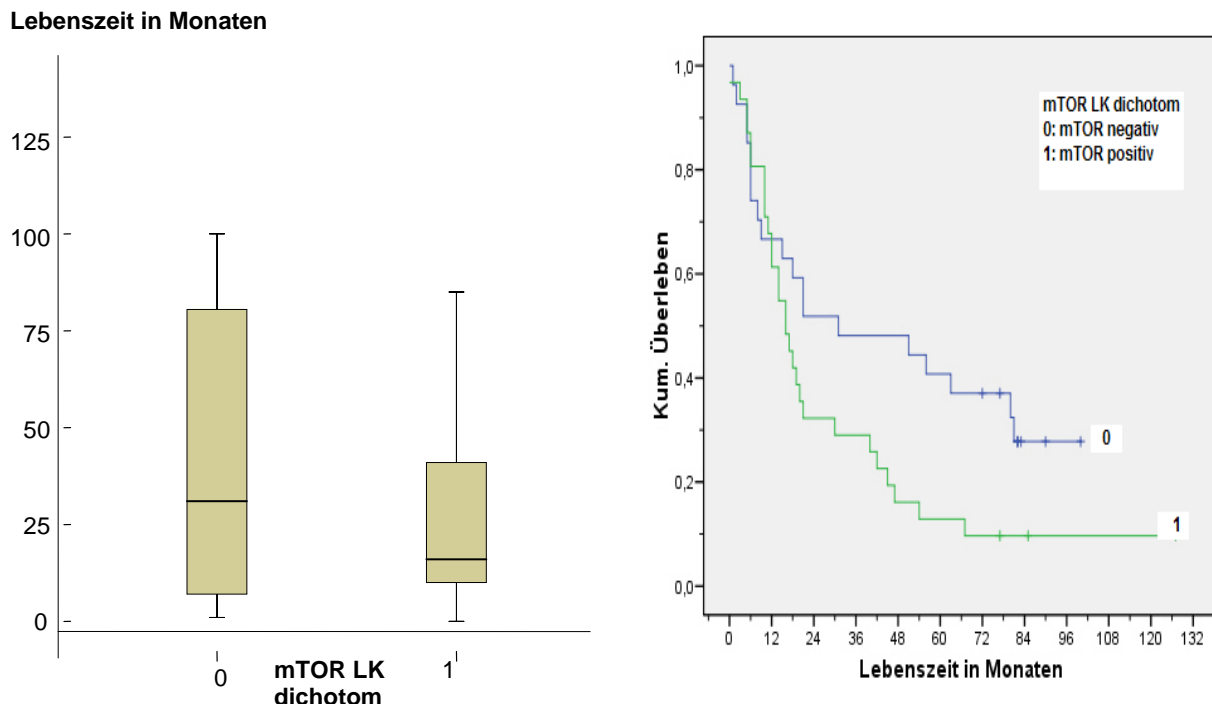


Abb.4-15. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem postoperativen Überleben („0“ = phospho-mTOR-negativ, „1“ = phospho-mTOR-positiv)

Wie bei anderen Tumorentitäten erwiesen sich auch im Magenkarzinom das T- ($p<0,001$) und das N-Stadium ($p=0,004$) sowie das Grading ($p=0,055$) als weitere wichtige prognostische

Marker: der postoperative Überlebenszeitraum sinkt demnach mit progredienter lokaler Tumorausdehnung, zunehmender Lymphknotenmetastasierung sowie fortschreitender Tumorzelldifferenzierung. Tab.4-11. zeigt die Ergebnisse der log-rank-Tests zum rezidivfreien und zum Gesamtüberleben.

4.7. Korrelationen zwischen phospho-mTOR, HIF-1 α , phospho-CREB, CD31 und CD105

Abschließend untersuchten wir mit Hilfe der Spearman's Rangkorrelation, ob die in dieser Studie analysierten Marker auch mit- bzw. untereinander korrelieren (siehe Tab.4-12. und 4-13.).

Dabei zeigten sich folgende Korrelationen:

- 1.) Sowohl bei phospho-mTOR ($p=0,026$), als auch bei HIF-1 α (Zyto, $p=0,017$) und phospho-CREB ($p=0,018$) zeigte sich, dass deren Expression im Primärtumor mit deren entsprechender Expression in Lymphknotenmetastasen signifikant korreliert. Dies bestätigt, dass das Genexpressionsprofil klonaler Tumorzellen auch noch nach peripherer Absiedlung (Lymphknotenmetastasen) dem des Ursprungstumors sehr stark ähnelt und so Rückschlüsse auf diesen erlaubt.
- 2.) Die phospho-mTOR-Expression im Magenkarzinom korreliert signifikant mit der phospho-CREB-Expression im Primärtumor ($p=0,014$) sowie mit der zytoplasmatischen HIF - 1 α - Expression im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen (Tumor: $p=0,085$; Lymphknoten: $p=0,036$).
- 3.) Die phospho-mTOR-Expression in Lymphknotenmetastasen korreliert signifikant mit der phospho-CREB-Expression im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen (Tumor:

p=0,012; Lymphknoten: p=0,017) sowie mit der zytoplasmatischen HIF-1 α -Expression im Primärtumor (p=0,011).

- 4.) Die zytoplasmatische HIF-1 α -Expression im Magenkarzinom korreliert mit der phospho-CREB-Expression im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen (Tumor: p=0,073; Lymphknoten: p=0,037).

	p-mTOR Tu	p-mTOR Lk	HIF-1 α Zyto Tu	HIF-1 α Zyto Lk	HIF-1 α Kern Tu	HIF-1 α Kern Lk
p-mTOR Tu	p=1,000	p=0,026	p=0,085	p=0,036	p=0,441	p=0,325
p-mTOR Lk	p=0,026	p=1,000	p=0,011	p=0,185	p=0,484	p=0,212
HIF-1 α Zyto Tu	p=0,085	p=0,011	p=1,000	p=0,017	p=0,132	p=0,561
HIF-1 α Zyto Lk	p=0,036	p=0,185	p=0,017	p=1,000	p=0,705	p=0,276
HIF-1 α Kern Tu	p=0,441	p=0,484	p=0,132	p=0,705	p=1,000	p=0,494
HIF-1 α Kern Lk	p=0,325	p=0,212	p=0,561	p=0,276	p=0,494	p=1,000
p-CREB Tu	p=0,014	p=0,012	p=0,073	p=0,591	p=0,133	p=0,355
p-CREB Lk	p=0,283	p=0,017	p=0,037	p=0,158	p=0,714	p=0,026
CD31 MW	p=0,324	p=0,907	p=0,462	p=0,242	p=0,532	p=0,587
CD31 Med	p=0,388	p=0,504	p=0,539	p=0,340	p=0,253	p=0,340
CD105 MW	p=0,816	p=0,687	p=0,100	p=0,508	p=0,361	p=0,344
CD105 Med	p=0,816	p=0,687	p=0,100	p=0,508	p=0,361	p=0,344

Tab.4-12. Korrelationen zwischen den verschiedenen immunhistochemischen Markern

Teil 1 (Spearman's Rang-Korrelation)

	p-CREB Tu	p-CREB Lk	CD31 MW	CD31 Med	CD105 MW	CD105 Med
p-CREB Tu	p=1,000	p=0,018	p=0,602	p=0,965	p=0,847	p=0,847
p-CREB LK	p=0,018	p=1,000	p=0,938	p=1,000	p=0,569	p=0,569
CD31 MW	p=0,602	p=0,938	p=1,000	p<0,001	p=0,986	p=0,986
CD31 Med	p=0,965	p=1,000	p<0,001	p=1,000	p=0,817	p=0,817
CD105 MW	p=0,847	p=0,569	p=0,986	p=0,817	p=1,000	p=1,000
CD105 Med	p=0,847	p=0,569	p=0,986	p=0,817	p=1,000	p=1,000

Tab.4-13. Korrelationen zwischen den verschiedenen immunhistochemischen Markern

Teil 2 (Spearman's Rang-Korrelation)

-
- 5.) Die phospho-CREB-Expression der Lymphknotenmetastasen korreliert wiederum mit der nuklearen HIF-1 α -Expression der Lymphknotenmetastasen ($p=0,026$).
 - 6.) Die Analyse der Tumervaskularisation zeigt den Trend einer Korrelation zwischen der CD105-Expression und der zytoplasmatisch HIF-1 α -Expression im Primärtumor bei Magenkarzinompatienten ($p=0,100$).

Dies bestätigt mehrfach unsere Hypothese, dass die mTOR-, HIF-1 α - und CREB-Signalwege im Magenkarzinom mit- bzw. untereinander verbunden sind und sich wechselseitig beeinflussen können.

5. Diskussion

Das Magenkarzinom gehört - neben dem kolorektalen und dem Pankreas-Karzinom - auch heute noch zu den drei häufigsten malignen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes [Hohenberger, 2003; Dicken, 2005; Parkin, 2005]. Zum Gegensatz zu Ländern mit hoher Magenkarzinominzidenz wie Japan, Korea und Taiwan fehlen in Europa staatlich-geförderte Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung (beispielsweise mittels Endoskopie oder Breischluck). Aufgrund der deutlich geringeren Gesamtinzidenz des Magenkarzinoms in Deutschland - verglichen mit östlichen Staaten und anderen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom - gibt es daher weiterhin keine evidenzbasierte Empfehlung zur Durchführung entsprechender „Screeningprogramme“ [Dicken, 2005; Roukos, 2000; Moehler, 2011]. Da in der Regel typische Beschwerden wie Bauchschmerzen, Völlegefühl, Dyspepsie, Abneigung gegenüber Fleisch, Gewichtsverlust, Fieber oder Nachtschweiß fehlen bzw. erst bei voranschreitender Tumorausbreitung auftreten, erscheint es nicht ausreichend, ausschließlich symptomatische Personen oder Risikopatienten (z. B. bei familiärer Häufung von Magenkarzinomen oder Polyposis-Syndromen, Z.n. Magenteilresektion oder Bestrahlung, Ulcera, adenomatöse Polypen, M. Ménétrier oder chronisch-atrophe Typ-A-Gastritis, siehe Kap.1.1.5.) entsprechenden Untersuchungen zuzuführen.

Letztendlich tragen beide Faktoren - das Fehlen frühzeitiger Vorsorgeprogramme und das späte Auftreten einer klinischen Beschwerdesymptomatik - dazu bei, dass sich gerade in europäischen Ländern ein Großteil der Tumorpatienten zum Diagnosezeitpunkt bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befindet und somit gehäuft deutlich älter und gesundheitlich geschwächer als der durchschnittliche Magenkarzinompatient in Hochrisikogebieten ist. Die ohnehin ungünstige Prognose der Magenkarzinompatienten wird v. a. in westlichen Nationen zum Teil

durch allzu extensive operative Eingriffe (mit erweiterter Lymphknotendisektion und routinemäßiger Spen- und Pankreatektomie) additiv verschlechtert, da Chirurgen in Ländern mit geringerer Magenkarzinominzidenz aufgrund der kleineren Eingriffszahl in der Regel weniger Expertise in den empfohlenen Operationsverfahren aufweisen [Katai, 2004; Moehler, 2011]. Durch strikte Durchführung einer D2-Disektion mit konsequenter Spen- und Pankreatektomie kann zwar scheinbar eine höhere Rate kurativer R0-Resektionen erzielt werden - aufgrund der damit verbundenen, erhöhten peri-/postoperativen Mortalität bzw. Letalität sowie verlängerter Hospitalisierungen ergibt sich jedoch statistisch ein insgesamt eher geringer Überlebensvorteil [Bonenkamp, 1999; Cuschieri, 1996].

Aufgrund der weiterhin beschränkten Behandlungsoptionen (nur ca. 50 % der Magenkarzinome sind einer kurativen Resektion überhaupt zugänglich) hat sich die Mortalitätsrate in den letzten 30 Jahren - trotz Fortschritten in der Tumorthherapie - kaum verändert. Der Anteil der Magenkarzinome an allen neoplastisch-bedingten Todesfällen stieg sogar von 3 auf 10% [Hohenberger, 2003; Dicken, 2005; Parkin, 2005; Roukos, 2000; Alberts, 2003; Moehler, 2011].

Wegen der hohen Rate an postoperativen Lokalrezidiven, lymphogenen Mikro- sowie hämatogenen Fernmetastasen (z.T. über 40-65%, vor allem in den ersten 2-3 Jahren nach Therapiebeginn) bedarf es somit auch nach kurativer R0-Resektion weiterer additiver Therapieoptionen [Roukos, 2000; Dicken, 2005; Moehler, 2011]. Dringend notwendige (neo-) adjuvante Therapieoptionen zeigten bislang nur mäßige Erfolge und weisen zum Teil hohe Nebenwirkungen auf (siehe Kap.1.1.6. und 1.1.7.). Daher sollten, unter Berücksichtigung sowohl patienten- (Tumorcharakteristika, Genexpressionsprofil, erwartetes Rückfallrisiko, persönliche Präferenzen) als auch behandlungsbezogener (evidenzbasierte Leitlinien, Nutzen-Risiko-Relation) Faktoren, gezielt die Patienten selektioniert werden, die vom additiven Einsatz intensivierter Behandlungsmethoden vermutlich am meisten profitieren. Gerade neuartige,

sogenannte „Target“-spezifische Medikamente, die bislang noch im Rahmen wissenschaftlicher Studien angewendet werden, bieten hierbei vielversprechende Ansatzpunkte zur Verbesserung der derzeitigen Anti-Tumorthherapie.

Während der Kanzerogenese verändern Tumorzellen ihre Genexpression, so dass sie ungehindert proliferieren, invasiv in das umgebende Gewebe einwachsen, unter sauer- und nährstoffarmen Bedingungen überleben und Fernmetastasen absiedeln können. Das Vorhandensein von Tumorphypoxie beeinflusst dabei die Expression zahlreicher Gene und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Onkogenese zahlreicher Malignome. Das zunehmende Wissen über deren prognostisch ungünstigen Einfluß (siehe Kap.1.2.1.) steigerte das Interesse an zentralen Regulatoren der Tumorzell-Stressantwort und an Behandlungsmethoden, die versuchen, den „Teufelskreis“ von Sauerstoffmangel, Therapieresistenz und hoher Rezidivrate zu durchbrechen.

Wir postulieren für diese Studie, dass eine vermehrte phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression bzw. Stabilisierung zur Progression des Magenkarzinoms beiträgt, diese Signalwege eine zentrale Rolle in dessen molekularen Pathogenese spielen und somit insgesamt mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

Um diese Fragestellung zu beantworten, analysierten wir die phospho-mTOR-, HIF-1 α - und phospho-CREB-Expression in Magenkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch und korrelierten diese mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern (Auswertung entsprechend der 6. Auflage der TNM-Klassifikation der Magenkarzinome von 1997) sowie dem postoperativen Patientenverlauf (vgl. Kap. 4.2.- 4.6.).

mTOR

Phospho-mTOR wurde in Tumorzellen stets zytoplasmatisch lokalisiert und konnte als Marker einer Lymphangiosis carcinomatosa herangezogen werden [Lang, 2007]. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen lieferte ein nahezu ausgewogenes Verhältnis phospho-mTOR-negativer (52%) und phospho-mTOR-positiver (48%) Magenkarzinome sowie phospho-mTOR-negativer (46%) und phospho-mTOR-positiver (54%) Lymphknotenmetastasen. Zudem konnte phospho-mTOR eindeutig in Gallengangsepithelien hepatischer Filiae nachgewiesen werden kann. Diese Feststellung sollte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

Die statistische Auswertung belegt, dass mTOR, aufgrund einer signifikanten Überexpression in N3-Tumoren ($p=0,015$) und dem Trend einer Korrelation mit dem Nodalstadium (Tumor: $p=0,100$, Lymphknoten: $p=0,088$), als potentieller Prädiktor für tumorösen Lymphknoten-Befall betrachtet werden kann. mTOR ist bei positiver Expression in gastralen Lymphknotenmetastasen mit einem kürzeren Patientenüberleben assoziiert (Lymphknoten: $p=0,053$). Zudem besteht eine signifikante Korrelation zwischen der nodalen mTOR-Expression und dem Resektionsstatus des Primärtumors ($p=0,019$), welche möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass bei mTOR-Positivität der Lymphknotenmetastasen bereits ein fortgeschrittenes lokales Tumorstadium vorlag, bei dem somit seltener eine kurative R0-Resektion erreicht werden konnte.

In einer 2010 publizierten Studie, bei der die mTOR-Expression in pT2b-Magenkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen ebenfalls anhand der immunhistochemischen phospho-mTOR-Detektion untersucht wurde [An, 2010], zeigten 36,5% der N0-Tumore, 39,2 % der N1- (1-2 Lymphknotenmetastasen) und 60,9% der N3- (mehr als 16 Lymphknotenmetastasen) Magenkarzinome eine eindeutige phospho-mTOR-Überexpression in den Tumorgewebeschnitten. Entsprechend den Ergebnissen unserer Analysen zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der phospho-mTOR-Expression der Magenkarzinome und der der Lymphknotenmetastasen

(siehe Kap. 4.7.). Die positive phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen der N1- und N3-Tumore stellte sich - was sich in unserer Studie als Trend andeutete (siehe Kap.4.6.1.) - als unabhängiger Prognosemarker für das rezidivfreie Überleben (DFS = disease free survival) heraus, die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) der N1-Tumore war mit 84,4% bei negativer phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen, verglichen mit 66,1% bei positiver, deutlich höher ($p=0,015$). Auch Magenkarzinompatienten mit N3-Tumoren zeigten bei phospho-mTOR-negativen Lymphknotenmetastasen eine mit 37,3%, verglichen mit 14,9% bei positiver nodaler phospho-mTOR-Expression, deutlich höhere 5-Jahres-Überlebensrate ($p=0,037$). Diese Arbeit ergab zudem eine lineare Korrelation zwischen der phospho-mTOR-Expression der Lymphknotenmetastasen und der Tumorrezidivrate (siehe Kap. 4.2.). In Übereinstimmung zu unseren Analysen konnte letztendlich nachgewiesen werden, dass die phospho-mTOR-Expression in pT2b-Magenkarzinomen mit dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung und die nodale phospho-mTOR-Expression mit einem kürzeren postoperativen Überleben korreliert. Da die phospho-mTOR-Expression (besonders die der Lymphknotenmetastasen) somit mit dem erhöhten Risiko einer lymphatischen Metastasierung (N+) und frühzeitiger Letalität verbunden ist, gilt mTOR als ungünstiger Prognosefaktor und sinnvolles therapeutisches „Target“ in der Magenkarzinom-Behandlung.

Mit der Erkenntnis, dass mTOR eine zentrale Rolle bei der Kanzerogenese diverser Tumor-entitäten wie eben dem Magenkarzinom spielt, eröffnete sich ein neuer Ansatzpunkt in der Anti-Tumorthapie. Rapamycin (Sirolimus, natürliches Makrolid-Antibiotikum mit fungizider, immunsuppressiver und antineoplastischer Wirkung) und seine Derivate („Rapalogs“, synthetisch hergestellte Analoga mit geringen chemischen Veränderungen) hemmen durch Komplexbildung mit FKBP-12 (FK506 Binding Protein-12) und mTOR (tenärer Komplex) die mTOR-Kinase-Aktivität und greifen somit maßgebend in den mTOR-Signalweg ein. In mehreren *in-vitro*-Unter-

suchungen konnte gezeigt werden, dass die Rapamycin-Wirkung einerseits auf einer Abnahme der Phosphorylierung der ribosomalen p70-S6-Kinase-1 und von 4E-BP1 beruht. Dies führt zu einer Reduktion der p70-S6-Kinase-1-Aktivität und zur Abnahme der 4E-BP1-Inaktivierung (und damit zu einer Hemmung des eukaryoten Initiationsfaktors eIF-4E). Andererseits gründet die Rapamycinwirkung aber auch auf einer Inhibition von HIF-1 α und seiner „downstream“-Gene [Wan, 2006; Sabatini, 2006]. Rapamycin wirkt somit 1.: durch Reduktion der Proteintranslation anti-proliferativ, 2.: durch Blockade der Zellzyklusprogression pro-apoptotisch und 3.: durch Abnahme der VEGF-Produktion anti-angiogen [Chiang, 2007; Thomas, 2006; Hudson, 2002; Sabatini, 2006; Easton, 2006; Semenza, 2002]. Bei *in-vivo*-Versuchen mit Rapamycin konnte eine deutliche Reduktion des subkutanen und orthotopen Tumorwachstums, der Tumorzellproliferation und der Tumervaskularisierung (gemessen an der CD31-Expression) nachgewiesen werden [Lang, 2007; Mita, 2003; Thomas, 2006]. Am Beispiel klarzelliger Nierenzellkarzinome konnte bereits gezeigt werden, dass bei Neoplasien mit einem Funktionsverlust des Tumorsuppressorproteins VHL (von-Hippel-Lindau-Protein) das lokale Tumorwachstum durch den Einsatz spezifischer mTOR-Inhibitoren gesenkt werden kann, da diese Pharmaka indirekt (über weitere Signalfaktoren) zu einer mTOR- sowie einer HIF-1 α -Expressionsabnahme führen können [Chiang, 2007; Sabatini, 2006].

Klinische Anwendungsstudien der Rapamycin-Derivate lassen bereits deutliche Therapieerfolge erkennen [Easton, 2006]. Durch immunhistochemische Analyse könnten künftig phospho-mTOR-positive Patienten herausgefiltert und deren Prognose durch den Einsatz gezielter mTOR-Inhibitoren verbessert werden.

HIF-1 α

Die Rolle von HIF-1 α , einem „downstream-Target“ von mTOR, bei der Pathogenese und Progression des Magenkarzinoms ist bis heute noch nicht hinreichend geklärt. Es wird diskutiert, dass reaktive Sauerstoffmetaboliten, die bei chronischen *Helicobacter-pylori*-Infektionen der Magenschleimhaut häufig vermehrt gebildet werden, durch erhöhte HIF-1 α -Stabilisierung die Magenkarzinomentstehung fördern [Griffiths, 2005; Yeo, 2004]. Auch konnte gezeigt werden, dass Mutationen unterschiedlicher Tumorsuppressorgene wie beispielsweise von p53, PTEN und VHL durch entsprechende Funktionsverluste in Tumorzellen zu einer konstitutiven Überexpression von HIF-1 α und seiner „downstream-Targets“ wie dem VEGF führen, was wiederum die hohe Gefäßdichte diverser Tumore erklärt [Maxwell, 1999]. Während die HIF-1 α -Überexpression somit das lokale und systemische Tumorwachstum bei zahlreichen Malignomen beschleunigt und so zu kürzerem rezidivfreien und Gesamtüberleben beiträgt [Generali, 2006; Hui, 2002; Semenza, 2007], lieferten Untersuchungen an Magenkarzinompatienten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Da der Großteil dieser Studien aber an japanischen Patientenkollektiven durchgeführt wurde, blieb die prognostische Bedeutung von HIF-1 α bei Magenkarzinomen der Europäer bislang offen.

Die Auswertung der immunhistochemischen HIF-1 α -Expression zeigte, dass 38,4% der Tumore und 48% der Lymphknotenmetastasen HIF-1 α zytoplasmatisch, aber nur 8,1% der Magenkarzinome und 6,9% der Lymphknotenmetastasen HIF-1 α nuklear exprimierten (siehe Kap.4.1.). Der nukleare Nachweis korrelierte dabei signifikant mit positiver Lymphknoten- (p=0,045) und fehlender Fernmetastasierung (p=0,021), der zytoplasmatische mit einem schlechten Grading (p=0,005). Die Auswertung der Daten des lokalen Tumorzentrums ergab jedoch, dass eine positive HIF-1 α -Expression, trotz gehäuft schlechterer Tumorzelldifferenzierung und höherem

Lymphknotenmetastasierungsstadium, die Prognose der Magenkarzinompatienten nicht wesentlich beeinflusst (siehe Kap.4.3.).

Entgegen einer Studie von Cabuk *et al.*, die keine Korrelationen zwischen der HIF-1 α - (sowie der VEGF- und CD34-) Expression und klinisch-pathologischen Patientendaten oder dem Gesamtüberleben nachweisen konnte [Cabuk, 2007], wurde HIF-1 α bereits mehrfach (auch in multivariaten Analysen) als entscheidender Prognosemarker im Magenkarzinom dargestellt [Qui, 2008; Sumiyoshi, 2006]. Der HIF-1 α -Nachweis korreliert demnach mit dem TNM-Stadium und der Invasionstiefe (in unserer Studie nicht analysiert), den Lymphknotenmetastasen sowie dem Grading. HIF-1 α scheint in die gastrale Karzinogenese involviert, und - bei positivem Nachweis an der Tumorinvasionsfront - mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein [Griffiths, 2007].

Seine Schlüsselrolle als zentralen Regulator sauerstoffabhängiger Adaptationsvorgänge bei Hypoxie macht HIF-1 α zu einem potenten Target in der Tumorthherapie. Da dessen Überexpression in Magenkarzinomen mit einer veränderten Tumervaskularisation, dem erhöhten Risiko für Behandlungsversagen sowie gesteigerter Mortalität assoziiert ist [Zhong, 1999; Semenza, 2002; Griffiths, 2005; Generali, 2006], erhofft man sich, durch Hemmstoffe oder Medikamente, die die Sauerstoffversorgung der Malignome verbessern, diesen Resistenzmechanismus zu durchbrechen. Eine Studie an subkutanen und orthotopen Tumormodellen der Maus, bei der ein dominant-negatives HIF-1 α -Plasmid verwendet wurde, lieferte hierbei bereits vielversprechende Erkenntnisse: Nach stabiler Transfektion humaner Magenkarzinomzellen mit dem dominant-negativen HIF-1 α -Plasmid dimerisiert diese mutierte HIF-1 α -Variante analog der Wildtyp-HIF-1 α -Untereinheit mit der endogenen HIF-1 β -Untereinheit, bildet in dieser Formation jedoch einen transkriptional-inaktiven HIF-1-Komplex. Diese „Anti-HIF-1 α -Tumorthherapie“ führte im Vergleich zu den Wildtyp-Xenografts zu einer Abnahme der VEGF-Expression, der Tumorgröße und

der Angiogenese, was auch in *in-vivo*-Studien nachgewiesen werden konnte [Stoeltzing, 2004]. Trotz dieses Wissens gelang es bislang jedoch kaum, spezifische „HIF-1 α -targeting-drugs“, also Pharmaka, die über Modulation von HIF-1 wirken, zu entwickeln [Semenza, 2007]. Positive Therapieeffekte wurden aber bereits eindeutig belegt [Yeo, 2004].

CREB

Genetische Alterationen des PI3K-/Akt-/mTOR-Signalweges, der durch Steuerung der Zellproliferation, Differenzierung, Angiogenese und Metastasierung im Zentrum der Onkogenese steht, betreffen neben der mTOR- und HIF-1 α - auch die CREB-Expression [Li, 2005; Du, 1998; Nicholson, 2002; Vivanco, 2002] (vgl. Kap.1.2.4.). Die statistische Auswertung der Gewebeschnitte, von denen je 27% der Primärtumore und der Lymphknotenmetastasen nuklear phospho-CREB positiv waren, ergab, dass die nodale phospho-CREB-Expression signifikant mit der lokalen Tumorausdehnung (T-Stadium) ($p < 0,001$) sowie dem Resektionsstatus R ($p = 0,002$) korreliert (vgl. Kap.4.4.). Wie bei mTOR (siehe oben) deutet somit möglicherweise auch bei CREB dessen positiver Nachweis in den Lymphknotenmetastasen von Magenkarzinompatienten auf primär fortgeschrittenere Tumorstadien hin, bei denen gehäuft eine kurative R0-Resektion nicht mehr erzielt werden konnte.

Frühere Untersuchungen an hepatozellulären Karzinomen ergaben, dass CREB unter hypoxischen Bedingungen eine deutliche Expressionszunahme aufweist und durch verbesserte CREB-CRE-Bindung seine Genexpression so verändert, dass das Tumorzellüberleben durch Selektion und Stressadaptation gefördert wird [Abramovitch, 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass gerade unter katabolen Bedingungen proangiogene Faktoren wie VEGF, Endothelin-1 und Adrenomedullin in soliden Tumoren nicht nur über HIF-1 α -abhängige, sondern auch über CREB-

induzierte Signalwege hochreguliert werden können [Abramovitch, 2004; Johannessen, 2004; Wu, 2007]. In zahlreichen Neoplasien wie dem Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) und der AML (akute myeloische Leukämie) erwies sich CREB daher als negativer Prognosemarker für das Gesamtüberleben und wurde als Proto-Onkogen eingestuft [Seo, 2008; Conkright, 2005]. Somit könnte auch der CREB-Signalweg - wie bereits am Beispiel des NSCLC und Prostatakarzinoms gezeigt - als „Target“ in der Therapie diverser Tumore und Leukämien dienen [Aggarwal, 2008; Kumar, 2007].

Tumervaskularisation

Da neben mTOR und HIF-1 α auch CREB die Angiogenese über proangiogene Faktoren wie VEGF verändern und dadurch das Tumorwachstum fördern kann (siehe Kap.1.2.5.), untersuchten wir im Weiteren die Tumervaskularisierung unter Zuhilfenahme der Endothelzellmarker CD31 und CD105 (vgl. Kap.4.5.). Die mittlere Gefäßanzahl (MVC) korrelierte dabei, gemessen an CD31 (Median), signifikant mit dem Nodalstadium ($p=0,037$), und, gemessen an CD105, mit dem Grading ($p=0,009$). Dies verdeutlicht die entscheidende Rolle einer suffizienten Gefäßversorgung bei der Tumorprogression, Entdifferenzierung und Metastasierung. Um jedoch differenzieren zu können, inwiefern Veränderungen der Vaskularisation auch tatsächlich die Gefäßanzahl selbst oder nur die Gefäßmorphologie betreffen, sind weitere Untersuchungen nötig, da auch bei unverändertem MVC intratumoral hypoxische Bedingungen mit Sauer- und Nährstoffmangel vorherrschen können [Stoeltzing, 2004].

Prognostische Bedeutung

Besonderes Interesse galt der Frage, welchen Einfluss die phospho-mTOR-, HIF-1 α -, phospho-CREB-, CD31- und CD105-Expressionen auf das Langzeit- und das rezidivfreie Überleben von

Magenkarzinompatienten haben. Dazu verglichen wir deren Expressionen 1. mit den Tumorrezidiven, dem Überleben und der Todesursache (t-Test, siehe Kap. 4.2. – 4.5.), und 2. mit dem rezidivfreien und dem Gesamtüberleben (Kaplan-Meier, log-rank-Test, siehe Kap.4.6.). Keiner der untersuchten Parameter schien das rezidivfreie Intervall (Zeitraum zwischen Operation und dem ersten Nachweis eines Rezidivs) signifikant zu beeinflussen und zur Abschätzung der Rezidivwahrscheinlichkeit geeignet zu sein (vgl. Kap.4.6.1.). Aufgrund der geringen Anzahl an Rezidivpatienten ($n = 11$) bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen an größeren Rezidiv-Kollektiven, um tatsächlich eine repräsentative Aussage treffen zu können.

„Survival“-Analysen nach Kaplan-Meier ergaben, dass sowohl das rezidivfreie Intervall als auch das Gesamtüberleben (definiert als Zeitraum zwischen Operation und Todestag bzw. - bei noch lebenden Patienten - dem Tag der letzten Nachsorgeuntersuchung (vgl. Kap.4.6.2.)) bei Tumoren mit positiver phospho-mTOR-, phospho-CREB- oder zytoplasmatischer HIF-1 α -Expression durchschnittlich kürzer war als bei entsprechendem negativem Nachweis. Daher kann nicht gänzlich abgestritten werden, dass diese drei Faktoren bei Magenkarzinompatienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Dennoch erwies sich aus statistischer Sicht nur der nodale mTOR-Nachweis ($p=0,049$) neben dem T- ($p<0,001$) und N-Stadium ($p=0,004$) (sowie dem Grading: $p=0,055$) als unabhängiger Prognosemarker für ein kürzeres Gesamtüberleben von Magenkarzinompatienten und scheint daher zur Abschätzung des postoperativen Verlaufs und zur Risikostratifizierung geeignet. Auch in einer britischen Studie korrelierte das Gesamtüberleben der Magenkarzinompatienten mit dem T- und N-Stadium sowie dem Grading, - im Gegensatz zu unseren Ergebnissen – aber auch mit der nuklearen HIF-1 α -Expression (univariate Analysen) [Griffiths, 2007]. In multivariaten Untersuchungen blieben jedoch nur das TNM-Gesamtstadium und das Resektionsausmaß als unabhängige Prognosefaktoren bestehen.

Korrelationen zwischen mTOR, HIF-1 α , CREB, CD31 und CD105

Abschließend analysierten wir mit Hilfe der Spearman's Rangkorrelation, ob die in unserer Studie immunhistochemisch-detektierten Marker mTOR, HIF-1 α , CREB, CD31 und CD105 im Magenkarzinom auch mit- bzw. untereinander korrelieren (vgl. Kap.4.7.). Hierbei fanden sich mehrere signifikante Korrelationen:

- 1.) Es zeigte sich, dass die phospho-mTOR-Expression der Primärtumore mit der Expression von phospho-CREB im Primärtumor ($p=0,014$) sowie mit der Expression von HIF-1 α (Zyto) im Primärtumor ($p=0,085$) bzw. in den Lymphknotenmetastasen ($p=0,036$) korreliert.
- 2.) Auch der nodale phospho-mTOR-Nachweis korrelierte mit der phospho-CREB-Expression im Primärtumor ($p=0,012$) bzw. in den Lymphknotenmetastasen ($p=0,017$) sowie mit der zytoplasmatischen HIF-1 α -Expression der Primärtumore ($p=0,011$).
- 3.) Desweiteren stellte sich heraus, dass die zytoplasmatische HIF-1 α -Expression der Magenkarzinomschnitte mit der phospho-CREB-Expression der Primärtumore ($p=0,073$) bzw. der Lymphknotenmetastasen ($p=0,037$) korreliert.
- 4.) Es fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem nuklearen HIF-1 α -Nachweis in den Lymphknotenmetastasen und der nodalen phospho-CREB-Expression ($p=0,026$).
- 5.) Die Korrelationsanalysen ergaben sowohl für mTOR ($p=0,026$) und HIF-1 α (Zyto, $p=0,017$), als auch für CREB ($p=0,018$), dass deren Lymphknoten-Expression mit der des jeweiligen Primärtumors korreliert, was verdeutlicht, dass das Genexpressionsmuster von Tumorzellen auch noch nach Metastasierung dem des Ursprungsgewebes signifikant ähnelt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl der mTOR-, als auch der HIF-1 α - und der CREB-Signalweg eine wesentliche Rolle im Magenkarzinom spielen, und dass sich - durch Korrelationsanalysen bestätigt - diese drei Faktoren wechselseitig beeinflussen. Offen bleibt nur, welche Pfade deren Signalwege mit- bzw. untereinander verbinden und so, summativ oder unabhängig voneinander, zur Magenkarzinomentstehung und -progression beitragen.

Welche Wirkung eine „Target“-spezifische, gegen mTOR, HIF-1 α oder CREB gerichtete Therapie tatsächlich erzielen kann, sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden. Spekulativ betrachtet könnte deren Anwendung, in Kombination mit etablierten Radio- bzw. Chemotherapieschemata oder aber mit Angiogenese-Hemmstoffen (wie Bevacizumab, Sunitinib, etc.), möglicherweise zu einer Verbesserung der bisherigen Prognose führen. Intensive Forschungsarbeiten sind aber Voraussetzung, das bisherige Wissen und Verständnis der Tumorbiologie zu erweitern und neue Wirkstoffe in die klinische Anwendung bringen zu können.

6. Zusammenfassung

Das Auftreten einer Gewebhypoxie stellt bei rasch wachsenden Karzinomen eine wesentliche Problematik dar, da hierdurch Stress-Signalwege moduliert und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die zu einem aggressiveren Tumorwachstum beitragen können. Insbesondere die Transkriptionsfaktoren **HIF-1 α** („Hypoxia-inducible-Factor-1 α “) und **CREB** („cAMP Response Element Binding Protein“) sowie die Signal-Komponente **mTOR** („mammalian Target of Rapamycin“) konnten als wesentliche Mediatoren einer Hypoxie-vermittelten Stressantwort identifiziert werden. Für die vorliegende Studie wurde postuliert, dass HIF-1 α , CREB sowie mTOR in der Progression des Magenkarzinoms eine wesentliche Rolle spielen und als prognostische Marker oder therapeutische „Targets“ dienen könnten.

Die Bedeutung der ausgewählten Signalmoleküle wurde durch immunhistochemische Analysen an humanen Tumorgeweben von Patienten mit einem chirurgisch resezierten Adenokarzinom des Magens (n=76) untersucht und entsprechend mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Die Ergebnisse zeigen, dass die genannten Transkriptionsfaktoren in variabler Expressionsstärke in den Tumoren sowie Lymphknotenmetastasen nachweisbar sind und mit einigen klinisch-pathologischen Parametern signifikant korrelieren:

- 1.) Eine hohe phospho-mTOR-Expression im Magenkarzinom korrelierte mit einer fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasierung (N3-Stadium), die phospho-mTOR-Expression in Lymphknotenmetastasen mit einem kürzeren Gesamtüberleben.
- 2.) Die zytoplasmatische HIF-1 α -Expression korrelierte mit einer schlechteren Differenzierung (Grading) des Magenkarzinoms und die nukleare HIF-1 α -Überexpression mit einem fortgeschrittenen Nodal-Stadium.

-
- 3.) Die phospho-CREB-Expression in Lymphknotenmetastasen korrelierte mit dem T-Stadium.
 - 4.) Da Hypoxie-induzierte Signalwege auch zu einer Induktion der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) führen, wurde zudem, durch CD31 und CD105, die Gefäßdichte in den Primärtumoren bestimmt. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Gefäßzahl und Lymphknotenmetastasierung sowie Tumorzelldifferenzierung.

Zusammenfassend könnten mTOR, HIF-1 α und CREB potentiell als prognostische Marker und molekulare „Targets“ dienen, da sie in Magenkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen exprimiert sind und mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern korrelieren.

7. Literaturverzeichnis

Publikationen

1. Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, Rechavi G, Galun E, Honigman A. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res* 2004; 64(4):1338-46.
2. Aggarwal S, Kim SW, Ryu SH, Chung WC, Koo JS. Growth suppression of lung cancer cells by targeting cyclic AMP response element-binding protein. *Cancer Res* 2008; 68(4):981-8.
3. Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 2:ii31-6.
4. An JY, Kim KM, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Bae JM, Kim S. Prognostic role of p-mTOR expression in cancer tissues and metastatic lymph nodes in pT2b gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010 Jun 15;126(12):2904-13.
5. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* 2003; 278(32):29655-60
6. Beitner-Johnson D, Millhorn DE. Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem* 1998; 273(31):19834-9.
7. Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, et al. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* 1999;340:908-14.
8. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG, Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 2004; 18(23):2893-904.
9. Cabuk D, Basaran G, Celikel C, Dane F, Yumuk PF, Iyikesici MS, Ekenel M, Turhal NS. Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology* 2007; 72(1-2):111-7.

10. Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 2007; 13(10):433-42.
11. Conkright MD, Montminy M. CREB: the unindicted cancer co-conspirator. *Trends Cell Biol* 2005; 15(9):457-9.
12. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006;355:11-20.
13. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, et al. Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group. *Lancet* 1996;347:995-9.
14. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* 2008;22:239-51.
15. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* 2005; 241(1):27-39.
16. Dimova EY, Jakubowska MM, Kietzmann T. CREB binding to the hypoxia-inducible factor-1 responsive elements in the plasminogen activator inhibitor-1 promoter mediates the glucagon effect. *Thromb Haemost* 2007; 98(2):296-303.
17. Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 1998; 273(49):32377-9.
18. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 2006; 25(48):6436-46.
19. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994;79(2):185-8.
20. Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Wigfield S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Gandolfi V, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL, Fox SB. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(15):4562-8.
21. Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR, Whitchelo N, Bishop PW, Ebert MP, Price PM, Welch IM, West CM. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2007; 96(1):95-103.

-
22. Griffiths EA, Pritchard SA, Welch IM, Price PM, West CM. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? *Eur J Cancer* 2005; 41(18):2792-805.
 23. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007;12:9-22.
 24. Hamik A, Wang B, Jain MK. Transcriptional regulators of angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(9):1936-47.
 25. Hohenberger P, Gretscher S. Gastric cancer. *Lancet* 2003; 362(9380):305-15.
 26. Hopfl G, Ogunshola O, Gassmann M. HIFs and tumors--causes and consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286(4):R608-23.
 27. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; 22(20):7004-14.
 28. Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Turley H, To KF, Poon TC, Zee B, Mo F, Teo PM, Huang DP, Gatter KC, Johnson PJ, Harris AL. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8(8):2595-604.
 29. Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 78(2):132-7.
 30. Jeon SH, Chae BC, Kim HA, et al. The PKA/CREB pathway is closely involved in VEGF expression in mouse macrophages. *Mol Cells* 2007;23:23-9.
 31. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12(7):363-9.
 32. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 1):C1172-80.
 33. Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? *Cell Signal* 2004; 16(11):1211-27.
 34. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Res* 2007; 17(4):324-32.

-
35. Katai H, Sano T, Sasako M, Fukagawa T, Saka M. Update on surgery of gastric cancer: new procedures versus standard technique. *Dig Dis* 2004;22:338-44.
 36. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56(1):1-9.
 37. Kim TH, Han SU, Cho YK, Kim MW. Perigastric lymph node status can be a simple prognostic parameter in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(35):1475-8.
 38. Kumar AP, Bhaskaran S, Ganapathy M, Crosby K, Davis MD, Kochunov P, Schoolfield J, Yeh IT, Troyer DA, Ghosh R. Akt/cAMP-responsive element binding protein/cyclin D1 network: a novel target for prostate cancer inhibition in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model mediated by Nexrutine, a *Phellodendron amurense* bark extract. *Clin Cancer Res* 2007; 13(9):2784-94.
 39. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, Ellis LM, Bolder U, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* 2007; 120(8):1803-10.
 40. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64:31-49.
 41. Li L, Ittmann MM, Ayala G, et al. The emerging role of the PI3-K-Akt pathway in prostate cancer progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005;8:108-18.
 42. Li W, Petrampol M, Molle KD, Hall MN, Battegay EJ, Humar R. Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circ Res* 2007;100:79-87.
 43. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001;345:725-30.
 44. Macdonald JS. Treatment of localized gastric cancer. *Semin Oncol* 2004; 31(4):566-73.
 45. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
 46. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(4 Suppl 1):S169-77.

47. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 2006; 5(16):1779-87.
48. Moehler M, Al-Batran SE, Andus T, et al. [German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer"]. *Z Gastroenterol* 2011;49:461-531.
49. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14(5):381-95.
50. Ng K, Meyerhardt JA, Fuchs CS. Adjuvant and neoadjuvant approaches in gastric cancer. *Cancer J* 2007;13(3):168-74.
51. Nomura T, Huang WC, Zhau HE, et al. Beta2-microglobulin promotes the growth of human renal cell carcinoma through the activation of the protein kinase A, cyclic AMP-responsive element-binding protein, and vascular endothelial growth factor axis. *Clin Cancer Res* 2006;12:7294-305.
52. O'Reilly SM, Leonard MO, Kieran N, Comerford KM, Cummins E, Pouliot M, Lee SB, Taylor CT. Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(2):C592-600.
53. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.
54. Qui M, Han B, Luo H, Zhang D, Xu F, Zhou Z, Li Y, He Y, Xu R. The prognostic impact of hypoxia inducible factor-1 α and p-Akt expressions in gastric adenocarcinoma. *Cancer Chemo Pharma* 2008
55. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, Takeda A, Akagi M, Ellis LM. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 2003; 60(2):199-207.
56. Roukos DH. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer Treat Rev* 2000; 26(4):243-55.
57. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(9):729-34.
58. Sastre J, Garcia-Saenz JA, Diaz-Rubio E. Chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(2):204-13.
59. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:551-78.

-
60. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8(4 Suppl):S62-7.
 61. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 2007; 12(19-20):853-9.
 62. Seo HS, Liu DD, Bekele BN, Kim MK, Pisters K, Lippman SM, Wistuba, II, Koo JS. Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68(15):6065-73.
 63. Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, Ellis LM. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(12):946-56.
 64. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 2001; 15(13):2445-53.
 65. Sumiyoshi Y, Kakeji Y, Egashira A, Mizokami K, Orita H, Maehara Y. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(17):5112-7.
 66. Taylor CT, Fueki N, Agah A, Hershberg RM, Colgan SP. Critical role of cAMP response element binding protein expression in hypoxia-elicited induction of epithelial tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 1999; 274(27):19447-54.
 67. Thomas GV. mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16(1):78-84.
 68. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003; 22(21):3213-20.
 69. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
 70. Wan X, Shen N, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. CCI-779 inhibits Rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1alpha/VEGF signaling. *Neoplasia* 2006;8:394-401.

71. Wang L, Rhodes CJ, Lawrence JC, Jr. Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1. *J Biol Chem* 2006; 281(34):24293-303.
72. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:851-64.
73. Wu D, Zhau HE, Huang WC, Iqbal S, Habib FK, Sartor O, Cvitanovic L, Marshall FF, Xu Z, Chung LW. cAMP-responsive element-binding protein regulates vascular endothelial growth factor expression: implication in human prostate cancer bone metastasis. *Oncogene* 2007; 26(35):5070-7.
74. Yao JC, Ajani JA. Gastric cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16(6):516-21.
75. Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6):1061-9.
76. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60(6):1541-5. S.7
77. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59(22):5830-5.

Bücher

Herold G, Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln; 2007

Webseiten

<http://globocan.iarc.fr>

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.3-1. HIF-1α-Nachweis mit der Avidin-Biotin-Methode (Vectastain ABC Kit)	18
Abb.4-1. phospho-mTOR-, HIF-1α- und phospho-CREB-Expression in intestinalen (1.Reihe) und diffusen (2.Reihe) N0-Magenkarzinomen	22
Abb.4-2. phospho-mTOR-, HIF-1α- und phospho-CREB-Expression in intestinalen Magenkarzinomen (N1-3) (1. Reihe) und deren Lymphknotenmetastasen (2. Reihe)	23
Abb.4-3. phospho-mTOR-, HIF-1α- und phospho-CREB-Expression in diffusen Magenkarzinomen (N1-3) (1. Reihe) und deren Lymphknotenmetastasen (2. Reihe)	24
Abb.4-4. phospho-mTOR-, HIF-1α- und phospho-CREB-Expression in Lymph- gefäßen der Lymphknotenmetastasen (Lymphangiosis carcinomatosa).....	25
Abb.4-5. HIF-1α-Expression in Endothelzellen von Magenkarzinomen	25
Abb.4-6. phospho-CREB-Expression im Normalgewebe (A: CREB negativ, B: CREB positiv), in Lymphozyten (C), Gefäßen (D), Gallengängen (E) und Lebermetastasen (F)	26
Abb.4-7. CD31- und CD105-Expresssion in intestinalen (1. Reihe) und diffusen Magen- karzinomen (2. Reihe)	27
Abb.4-8. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren mit dem N-Stadium.....	29
Abb.4-9. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Lymphknoten- metastasen mit dem N-Stadium.....	30
Abb.4-10. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Lymphknoten- metastasen mit dem Gesamtüberleben	32
Abb.4-11. Korrelation der zytoplasmatischen HIF-1α-Expression in den Primär- tumoren mit der Differenzierung (Grading)	34
Abb.4-12. Korrelation der phospho-CREB-Expression in den Lymphknoten- metastasen mit dem T-Stadium.....	36

Abb.4-13. Korrelation der CD31-Expression in den Primärtumoren mit dem N-	
Stadium.....	38
Abb.4-14. Korrelation der CD105-Expression in den Primärtumoren mit dem	
Grading.....	39
Abb.4-15. Korrelation der phospho-mTOR-Expression in den Lymphknotenmeta-	
stasen mit dem postoperativen Überleben („0“ = phospho-mTOR-negativ, „1“ =	
phospho-mTOR-positiv)	42

9. Tabellenverzeichnis

Tab.3-1. Klinisch-pathologische Aspekte des untersuchten Patientenkollektivs	15
Tab.3-2. Bei der Immunhistochemie verwendete primäre (monoklonale) Antikörper ..	16
Tab.4-1. Übersicht der Korrelationsanalysen der phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit klinisch-patholog. Parametern.....	29
Tab.4-2. Übersicht der Korrelationsanalysen der phospho-mTOR-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit dem post-operativen Verlauf.....	31
Tab.4-3. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1α-Expression in den Primärtumoren mit klinisch-pathologischen Parametern	33
Tab.4-4. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1α-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit klinisch-pathologischen Parametern	34
Tab.4-5. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1α-Expression in den Primärtumoren mit dem postoperativen Verlauf.....	35
Tab.4-6. Übersicht der Korrelationsanalysen der HIF-1α-Expression in den Lymphknotenmetastasen mit dem postoperativen Verlauf.....	35
Tab.4-7. Übersicht der Korrelationsanalysen der phospho-CREB-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit klinisch-patholog. Parametern.....	36
Tab.4-8. Übersicht der Korrelationsanalysen der phospho-CREB-Expression in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen mit dem post-operativen Verlauf	37
Tab.4-9. Übersicht der Korrelationsanalysen der CD31-/105-Expression in den Primärtumoren mit klinisch-pathologischen Parametern.....	38
Tab.4-10. Übersicht der Korrelationsanalysen der CD31-/105-Expression in den Primärtumoren mit dem postoperativen Verlauf.....	39
Tab.4-11. Korrelationen zwischen p-mTOR, HIF-1α, p-CREB, CD31, CD105 sowie	

klinisch-pathologischen Parametern mit dem rezidivfreien und dem Gesamt- überleben (univariate Analyse unter Anwendung des log-rank-Tests, MW = Mittelwert, KI = Konfidenzintervall).....	41
Tab.4-12. Korrelationen zwischen den verschiedenen immunhistochemischen Markern Teil 1 (Spearman´s Rang-Korrelation).....	44
Tab.4-13. Korrelationen zwischen den verschiedenen immunhistochemischen Markern Teil 2 (Spearman´s Rang-Korrelation).....	44

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 06.01.2012

(Silvia Kainz)